

Untersuchungen zur Expression des TIM-3 Moleküls auf murinen T-Helfer-Zellen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biochemikerin Orissa Bender
(geb. 4. Oktober 1974 in Berlin, Deutschland)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter:

1. Prof. Dr. Richard Lucius
2. Priv. Doz. Dr. Thomas Kamradt
3. Prof. Dr. Roland Lauster

Tag der Einreichung: 23. April 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 27. August 2003

für Oma, Papa, Mama und Na Noi

Abstract

Die von T-Helfer (Th) -Zellen produzierten Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Einleitung, der Aufrechterhaltung und der Regulation von Immunantworten. Bei der Untersuchung von Immunantworten hat sich eine vereinfachte Einteilung der Th-Zellen in zwei Klassen als hilfreich erwiesen: Th1 und Th2. Stabil differenziell exprimierte Oberflächenmoleküle werden benötigt, um lebende Th1- und Th2-Zellen identifizieren, auf Einzelzellebene charakterisieren und möglicherweise die von ihnen erzeugten Immunantworten modulieren zu können. Auf der Suche nach solchen Molekülen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Millennium Pharmaceuticals das Oberflächenmolekül TIM-3 entdeckt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass TIM-3 nicht nur von CD4⁺ Th-Zellen, sondern auch von CD8⁺ T-Zellen, gamma/delta-T-Zellen, sowie einigen Makrophagen und der Mehrheit der dendritischen Zellen in der Milz von Mäusen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Expression von TIM-3 auf Th-Zellen ist klar mit einem aktivierten Phänotyp assoziiert. TIM-3 wird unter polarisierenden Bedingungen *in vitro* im Vergleich zu Th2-Zellen bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich von Th1-Zellen exprimiert. Erstmals wurde auf Einzelzellebene die Zytokinproduktion TIM-3 exprimierender Th-Zellen untersucht. Die Analyse von Th0-Zellen, welche unter nichtpolarisierenden Bedingungen *in vitro* hergestellt wurden, ergab keine bevorzugte Produktion von Th1-Zytokinen und keine verminderte Expression von Th2-Zytokinen durch TIM-3 exprimierende Th-Zellen. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse erlaubt die Expression von TIM-3 allein daher nicht die Identifizierung von Th1-Zellen. Nach einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* lag jedoch eine bevorzugte Assoziation zwischen der Expression von TIM-3 und der pathogenspezifischen Produktion von Interferon (IFN)-gamma, Interleukin (IL)-2 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)-alpha vor. Somit korreliert die TIM-3 Expression auf Th-Zellen nur unter bestimmten Bedingungen mit einem Th1-Phänotyp.

TIM-3
Th1/Th2
Zytokin
Koexpression
murine Infektionsmodelle

Abstract

The cytokines that are produced by T helper (Th) cells are decisive for the initiation, the maintenance and the regulation of immune responses. A simplified classification of Th cells has proven to be useful for the analysis of immune responses: Th1 and Th2. Stably and differentially expressed surface molecules are required for the identification of live Th1- and Th2-cells, their characterisation at the single cell level and the possible modulation of the immune responses that they induce. On the search for such molecules the surface molecule TIM-3 was discovered in collaboration with Millennium Pharmaceuticals. The present work shows that TIM-3 protein is not only expressed on the cell surface by CD4⁺ Th cells but also by CD8⁺ T cells and gamma/delta T cells as well as by some macrophages and the majority of the dendritic cells in the murine spleen. TIM-3 expression on Th cells is clearly associated with an activated phenotype. Under polarising conditions *in vitro* TIM-3 is expressed preferentially albeit not exclusively by Th1 cells compared to Th2 cells. For the first time, the cytokine production of TIM-3 expressing Th cells has been analysed at the single cell level. The analysis of Th0 cells, generated under non-polarising conditions *in vitro* showed no preferential production of Th1-cytokines and no diminished production of Th2-cytokines by TIM-3 expressing Th-cells. The results obtained in this work lead to the conclusion that expression of TIM-3 does not permit the identification of Th1-cells. However upon infection with *Toxoplasma gondii* a positive association between the expression of TIM-3 and the pathogen-specific production of Interferon (IFN)-gamma, Interleukin (IL)-2 and Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha was observed. Therefore the expression of TIM-3 on Th-cells only correlates under specific conditions with a Th1-phenotype.

TIM-3
Th1/Th2
cytokine
coexpression
murine infection models

Inhaltsverzeichnis

Zielsetzung	1
1 Einleitung	2
1.1 T-Zellen	3
1.2 Präsentation und Erkennung von Antigen	4
1.3 T-Zellaktivierung	5
1.4 Differenzierung von Th-Zellen	7
1.4.1 Th-Subpopulationen	7
1.4.2 Polarisierung durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren	9
1.4.3 Stabilisierung durch epigenetische Modifikationen	12
1.4.4 Funktion von Th1- und Th2-Zellen	13
1.5 Th-Zellen und Infektionen	14
1.5.1 Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.5.2 Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	16
1.5.3 Infektion mit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	17
1.6 Th-Zellen und Autoimmunerkrankungen	18
1.6.1 Arthritis	18
1.6.2 Systemischer Lupus Erythematosus	19
1.7 Identifizierung von Th1- und Th2-Zellen	19
1.8 TIM-3	21
2 Material	23
2.1 Mäuse	23
2.2 Infektionsmodelle	24
2.3 Chemikalien und Enzyme	24
2.4 Puffer und Medien	25
2.4.1 Sterile Puffer und Medien für die Zellkultur	25
2.4.2 Puffer für die Durchflusszytometrie	26
2.4.3 Puffer für ELISA	26
2.4.4 Puffer für die Molekularbiologie	26
2.5 Antikörper und rekombinante Zytokine für die Zellkultur	27
2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie	27
2.6.1 Antikörper gegen murine Oberflächenmoleküle	28
2.6.2 Antikörper gegen murine intrazelluläre Zytokine	29
2.6.3 Sekundärfarbstoffe	29
2.7 Proteine und Antikörper für ELISA und Immunisierungen	30
2.8 MACS-Beads und Säulen für Zellsortierungen	30
2.9 Synthetisches Peptid	30
2.10 Primer	31

2.11	Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien	31
2.12	Geräte	32
2.13	Grafische Darstellung und Statistik	32
3	Methoden	33
3.1	Tierversuche	33
3.1.1	Markierung	33
3.1.2	Genotypisierung der TIM-3 ^{-/-} Mäuse	33
3.1.2.1	Entnahme von Schwanzproben	33
3.1.2.2	Isolierung von genomischer DNA	33
3.1.2.3	PCR	33
3.1.2.4	Tierzucht	35
3.1.3	Immunisierungen und Infektionen	36
3.1.3.1	Immunisierung von Mäusen mit GPI zur Induktion einer Arthritis	36
3.1.3.2	Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin	37
3.1.3.3	Immunisierung von Mäusen mit SEB	37
3.1.3.4	Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	38
3.1.3.5	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	38
3.1.3.6	Infektion mit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	38
3.1.4	Bestimmung der Proteinurie	38
3.1.5	Blut- und Serumgewinnung	38
3.1.6	Euthanasie und Entnahme der Organe	39
3.2	Zellbiologische Methoden	40
3.2.1	Allgemeine Voraussetzungen	40
3.2.2	Isolierung von Lymphozyten aus verschiedenen Geweben	40
3.2.2.1	Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut	40
3.2.2.2	Isolierung von Splenozyten	40
3.2.2.3	Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten	40
3.2.2.4	Isolierung von IEL und LPL aus Dünndarm	41
3.2.2.5	Isolierung hepatischer Lymphozyten	41
3.2.2.6	Isolierung von Lymphozyten aus der Lunge	41
3.2.2.7	Isolierung von Lymphozyten aus dem Knochenmark	42
3.2.3	Zählen von Zellen	42
3.2.4	Sortieren von Zellen mittels MACS	42
3.2.5	<i>In vitro</i> Kultur von Mauszellen	44
3.2.5.1	Allgemeine Voraussetzungen	44
3.2.5.2	Herstellung und Kultur muriner T-Zelllinien	45
3.3	ELISA	46
3.4	Durchflusszytometrie	47
3.4.1	Grundlagen	47
3.4.2	Oberflächenfärbung	49
3.4.3	Intrazelluläre Färbung	50
3.4.3.1	Stimulierung der Zellen	50
3.4.3.2	Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd	50

3.4.3.3	Intrazelluläre Färbung	51
3.4.4	Analyse der Koexpression	51
4	Ergebnisse	52
4.1	TIM-3 Expression.....	52
4.1.1	Expression von TIM-3 auf verschiedenen Zellpopulationen.....	52
4.1.2	TIM-3 Expression auf T-Zellen in verschiedenen Organen und unterschiedlichen Inzuchtstämmen.....	56
4.1.3	Einfluss von Infektionen auf die TIM-3 Expression.....	58
4.1.3.1	Infektion mit dem intrazellulären Erreger <i>Toxoplasma gondii</i>	59
4.1.3.2	Infektion mit dem intrazellulären Bakterium <i>Listeria monocytogenes</i>	62
4.1.3.3	Infektion mit dem Nematoden <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	65
4.1.4	Einfluss von Entzündungen auf die TIM-3 Expression	66
4.1.4.1	Arthritis	66
4.1.4.2	Systemischer Lupus Erythematosus (SLE).....	67
4.1.5	Assoziation der TIM-3 Expression mit Aktivierungsmarkern auf Th-Zellen.....	68
4.2	Assoziation der TIM-3 Expression mit einem Th1-Phänotyp	70
4.2.1	Kinetik der TIM-3 Expression auf Th-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation.....	70
4.2.2	Zytokinexpression von TIM-3 ⁺ Th-Zellen	72
4.2.2.1	Zytokinexpression von TIM-3 ⁺ Th-Zellen <i>in vitro</i>	73
4.2.2.2	Zytokinexpression von TIM-3 ⁺ Th-Zellen <i>ex vivo</i> nach Infektion	75
4.2.2.3	Zytokinexpression von TIM-3 ⁺ Th-Zellen <i>ex vivo</i> in MRL/lpr Mäusen.....	78
4.2.3	Assoziation der TIM-3 Expression mit einem Th2-Marker	81
4.2.4	Expression von TIM-3 in IFN- γ defizienten Mäusen	82
4.3	Untersuchung der Funktion der TIM-3 Expression	84
4.3.1	Einfluss auf die thymische T-Zell-Reifung	84
4.3.2	Einfluss auf die Zellhomöostase und die Organverteilung	85
4.3.3	Einfluss auf die Verteilung von naiven, Gedächtnis und regulatorischen Th-Zellen	87
4.3.4	Einfluss auf die Differenzierung von Th-Zellen.....	88
4.3.4.1	Einfluss von anti-TIM-3 Antikörper und TIM-3 Fusionsprotein.....	88
4.3.4.2	Untersuchung TIM-3 defizienter Mäuse	90
4.3.5	Einfluss auf die Antikörper-Antwort nach einer Immunisierung.....	92
4.3.6	Einfluss auf die T-Zell-Apoptose	94
5	Diskussion	96
5.1	Expression von TIM-3.....	96
5.2	Assoziation der TIM-3 Expression mit einem Th1-Phänotyp.....	99
5.3	Immunologische Funktion der TIM-3 Expression	102
5.4	Perspektiven.....	103
	Zusammenfassung.....	106
	Abkürzungsverzeichnis	107
	Literaturverzeichnis	111
	Danksagung.....	124

Eidesstattliche Erklärung	125
Publikationen und Präsentationen	126

Zielsetzung

Die von T-Helfer (Th) -Zellen produzierten Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Einleitung, der Aufrechterhaltung und der Regulation von Immunantworten. Bei der Untersuchung von Immunantworten hat sich eine vereinfachte Einteilung der Th-Zellen in zwei Klassen als hilfreich erwiesen: Th1 und Th2. Die Identifizierung dieser Zellen erfolgt hauptsächlich aufgrund ihrer Zytokinproduktion und der Expression von Transkriptionsfaktoren. Die Zytokinproduktion ist transient und wird in den meisten Fällen in den Überständen von Zellkulturen oder in fixierten und permeabilisierten Zellen gemessen. Die Expression von Transkriptionsfaktoren kann bislang nur in Zell-Lysaten auf mRNA-Ebene untersucht werden.

Aus diesem Grund werden stabil differenziell exprimierte Oberflächenmoleküle benötigt, um lebende Th1- und Th2-Zellen identifizieren, auf Einzelzellebene charakterisieren und möglicherweise die von ihnen erzeugten Immunantworten modulieren zu können. Auf der Suche nach solchen Molekülen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Millennium Pharmaceuticals das Oberflächenmolekül TIM-3 entdeckt. Dabei wurde gezeigt, dass das Gen für TIM-3 stärker von aktivierten Th1-Zellen und nicht von aktivierten Th2-Zellen transkribiert wird. Zu Beginn der Untersuchung gab es darüber hinaus keine weiteren Informationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von TIM-3 auf T-Zellen und insbesondere Th-Zellen auf Proteinebene zu charakterisieren. Die Assoziation zwischen der Expression des TIM-3 Moleküls auf Th-Zellen und einem Th1-Phänotyp sollte überprüft werden. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, welche Zytokine von TIM-3 exprimierenden Th-Zellen gebildet werden. Ferner sollten mögliche immunologische Funktionen der TIM-3 Expression auf Th-Zellen untersucht werden.

1 Einleitung

Das Immunsystem höherer Vertebraten hat sich im Lauf der Evolution zu einem komplexen System entwickelt, in dem viele verschiedene Zelltypen über direkten Zellkontakt oder lösliche Botenstoffe miteinander kommunizieren und interagieren. Es hat die Aufgabe, den Organismus vor Infektionen zu schützen, die durch eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene hervorgerufen werden, und entartete Zellen unschädlich zu machen. Man unterscheidet zwischen der natürlichen oder angeborenen und der erworbenen oder adaptiven Immunität.

Die angeborene Immunität wird durch das Komplementsystem und von Makrophagen, Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile), dendritischen Zellen, Mastzellen und Natürlichen Killer (NK)-Zellen vermittelt. Ein wichtiges Element der angeborenen Immunität ist die Erkennung von Erregern oder infizierten Zellen aufgrund allgemeiner, häufig wiederkehrender, pathogen-spezifischer Strukturmerkmale, den sogenannten PAMPs (engl.: pathogen associated molecular pattern), über sogenannte PRR (engl.: pattern recognition receptor), wie beispielsweise die Mitglieder der TLR (engl.: Toll-like receptor) -Familie (Akira and Hemmi, 2003; Akira et al., 2001; Takeda et al., 2003).

Daneben hat sich in höheren Wirbeltieren die adaptive Immunität entwickelt, die vor allem durch B- und T- Lymphozyten vermittelt wird. Diese Zellen sind für die Spezifität und die Variabilität des Immunsystems verantwortlich, indem sie klonale Oberflächenrezeptoren, die B-Zell- und T-Zellrezeptoren, exprimieren, die für jede Zelle zufällig durch somatische Rekombination aus verschiedenen Gensegmenten zusammengesetzt werden. Durch die große Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten wird die Variabilität bei der Erkennung spezifischer Strukturen (Antigene) erreicht. Eine zweite wichtige Eigenschaft der adaptiven Immunität besteht in der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses, die dazu führt, dass bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen (Ag) eine schnellere und besser angepasste Immunreaktion stattfinden kann. Die Grundlage dafür sind sogenannte langlebige T- und B-Gedächtniszellen, die im Verlauf einer Immunantwort gebildet werden können (Ahmed and Gray, 1996).

Infektiöse Krankheitserreger werden in fünf Gruppen unterteilt: Viren, Bakterien, Pilze, Helminthen (Würmer) und Protozoen. Würmer und Protozoen werden unter dem Oberbegriff Parasiten zusammengefasst. Intra- oder extrazelluläre Bakterien, Viren, Pilze, Würmer und andere ein- oder mehrzellige Parasiten unterscheiden sich nicht nur in ihren antigenen Strukturen, sondern hinzukommend in ihren Infektionsstrategien und ihrer pathogenen Wirkung stark voneinander. Neben der spezifischen Erkennung erfordern derart unterschiedliche Erreger auch unterschiedliche Maßnahmen zu ihrer erfolgreichen Bekämpfung. Adaptive Immunantworten lassen sich grundsätzlich in zwei unterschiedliche

Klassen einteilen, humorale und zelluläre Antworten. Die humorale Antwort ist vor allen Dingen gegen extrazelluläre Erreger gerichtet und wird von löslichen, spezifischen Antikörpern vermittelt, die von Plasmazellen und aktivierten B-Lymphozyten sezerniert werden. Beispiele für die über Antikörper vermittelten Abwehrreaktionen sind die Aktivierung der Komplementkaskade sowie die Phagozytose. Bei der zellulären Antwort werden intrazelluläre Erreger und die von ihnen infizierten Zellen von Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (ZTL) eliminiert.

1.1 T-Zellen

Die beiden Klassen von Lymphozyten entwickeln sich wie alle Zellen des Blutes aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die Bezeichnung der B-Zellen leitet sich von der Bursa Fabricii ab, die für die B-Zell-Entwicklung bei Vögeln verantwortlich ist. Die B-Lymphozyten der Säugetiere differenzieren überwiegend im Knochenmark zu reifen B-Zellen, während unreife Vorläufer der T-Lymphozyten in den Thymus migrieren (Thymozyten), wo sie weitere Reifungsprozesse durchlaufen, bevor sie als reife T-Zellen in die Peripherie wandern. In diesem Kontext wird mit Peripherie der gesamte Körper bis auf das Knochenmark und den Thymus bezeichnet. Nachdem die naiven T-Zellen den Thymus verlassen haben, zirkulieren sie zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques hin und her. T-Zellen erkennen Antigene mit ihrem klonalen T-Zellrezeptor (TZR), wobei klonal bedeutet, dass jede individuelle T-Zelle nur einen bestimmten TZR in vielen identischen Kopien auf ihrer Oberfläche exprimiert. Über den TZR werden ausschließlich solche antigenen Peptide erkannt, die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC von engl.: major histocompatibility complex) gebunden sind (Bjorkman, 1997).

Der TZR auf der Mehrheit der T-Zellen ist ein Heterodimer aus einer α -(40-60 kDa) und einer β -Polypeptidkette (40-50 kDa) (α/β -T-Zellen). Einige T-Zellen exprimieren einen Rezeptor mit einer γ - und einer δ -Untereinheit (γ/δ -T-Zellen) und scheinen andere Eigenschaften und Funktionen zu besitzen (Bluestone et al., 1995).

Eine große Anzahl membranständiger Glykoproteine, die eine Rolle bei Immunantworten spielen, wurde ursprünglich aufgrund der Reaktivität monoklonaler Antikörper bestimmt. Verschiedene Antikörper, die dasselbe Oberflächenmolekül erkennen, bilden ein sogenanntes „cluster“. Eine Vielzahl immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle wird deshalb nach einer konventionellen internationalen Nomenklatur CD (engl.: cluster of differentiation) benannt und nummeriert (Lai et al., 1998).

α/β -T-Zellen werden anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle in zwei Klassen unterteilt, nämlich die $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) und die $CD8^+$ T-Zellen. Das früheste Stadium in der Thymozytenentwicklung ist die sogenannte doppelt negative Zelle,

welche weder den CD3/ TZR-Komplex noch den CD4 oder den CD8 Korezeptor exprimiert. Nach Expression der *Rag1* und *Rag2* (engl: recombinase activating gene 1 und 2) Gene, können die TZR- β -Gene umgeordnet werden. Die T-Zellen werden $CD3^+ TZR^+$ und exprimieren sowohl CD4 als auch CD8. Die doppelt positiven Vorläuferzellen ordnen nun die α -Kette des TZR um und verlassen nach positiver und negativer Selektion durch Interaktion mit thymischen Epithelzellen und dendritischen Zellen als Einzelpositive $CD4^+ CD8^-$ oder $CD8^+ CD4^-$ T-Zelle den Thymus (Janeway and Travers, 1997).

1.2 Präsentation und Erkennung von Antigen

Jede Kette des TZR ist ein integrales Membranprotein mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und zwei extrazellulären Immunglobulin (Ig)-Domänen, die an der Bindung von MHC und Peptid beteiligt sind. Für die Weiterleitung des Ligandenbindungssignals in den zytoplasmatischen Raum ist der TZR mit dem CD3 Molekül assoziiert (s. Abb 1.1). Außerdem kooperieren die Korezeptormoleküle CD4 und CD8 bei der Antigenerkennung mit dem TZR und wirken stabilisierend, indem sie ebenfalls an das entsprechende MHC-Molekül binden. Das CD4 Molekül ist ein Monomer, welches mit dem MHC-Klasse-II Molekül interagiert. Das CD8 Molekül bei T-Zellen mit α/β TZR ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette und bindet an MHC-Klasse-I Moleküle.

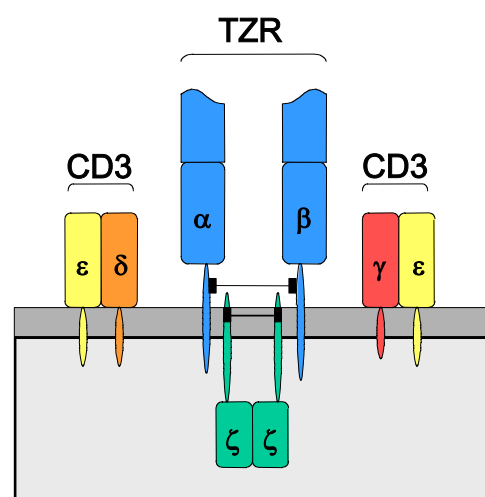


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des TZR/CD3-Komplexe.

Der TZR auf der Mehrheit der T-Zellen ist ein Heterodimer aus je einer hochvariablen α - und β -Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden und im Komplex mit den CD3-Heterodimeren ϵ/δ und γ/ϵ und dem CD3-Homodimer ζ/ζ in die Zellmembran eingelagert sind. Der α/β -TZR erkennt das Antigen. Die sechs CD3-Ketten signalisieren ins Innere der Zelle, dass eine Antigenbindung stattgefunden hat (nach Charles A. Janeway und Paul Travers, *Immunologie*, 2. Aufl., S.161, Spektrumverlag 1997).

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, die unterschiedlich auf verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Wirbeltierzellen exprimiert und präsentieren im Wesentlichen zytosolische Peptide. Komplexe aus ca. 8-10 Aminosäure (AS) langen Peptiden und MHC-I-Molekülen werden von $CD8^+$ T-Zellen erkannt.

MHC-Klasse-II-Moleküle werden konstitutiv nur von spezialisierten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, auf der Oberfläche exprimiert (Janeway and Travers, 1997). Makrophagen und B-Zellen präsentieren vor allem lösliche Antigene, die aus der Umgebung gefiltert werden. Dendritische Zellen sind in einem unreifen Stadium mit geringer T-Zell stimulierender Aktivität in den meisten nichtlymphatischen Geweben präsent, wo sie kontinuierlich Antigene aufnehmen und prozessieren. Entzündliche Mediatoren oder mikrobielle Substanzen bewirken die Migration der dendritischen Zellen in sekundäre lymphatische Organe, wobei sie reifen, ihre Fähigkeit, Antigen aufzunehmen, verlieren und dafür verstärkt in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren (Lanzavecchia and Sallusto, 2000). Aufgrund dieser migratorischen Eigenschaft unterscheiden sie sich von den im Gewebe residierenden Makrophagen. Durch MHC-Klasse-II-Moleküle werden auf den APZ in der Regel Peptide von extrazellulären Antigenen präsentiert, die von ihnen durch Phagozytose aufgenommen wurden. $CD4^+$ T-Helfer-Zellen erkennen ungefähr 10-26 AS lange Peptide in der Peptidbindungsdomäne des MHC-Klasse-II-Moleküls.

Die MHC-Gene sind hochpolymorph. Die Loci werden beim Menschen HLA (engl.: Human Leucocyte Antigens) und bei der Maus H-2 (für Histokompatibilität) genannt. Bei der Maus sind A und E die beiden Klasse-II-Loci, K und D sind die funktionellen Klasse-I-Loci. Mit kleinen hochgestellten Buchstaben werden bestimmte Allelkombinationen bezeichnet.

1.3 T-Zellaktivierung

Allerdings genügt die Bindung des Peptid-MHC-Komplexes an den TZR/CD3-Komplex und die Korezeptoren, entweder CD4 oder CD8, nicht, um die naive T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung zu stimulieren. Die klonale Expansion der antigenspezifischen naiven T-Zellen benötigt ein zweites, kostimulatorisches Signal. Im Fall von $CD4^+$ T-Zellen wird dieses Signal über die Bindung von kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen an deren Liganden auf der APZ geliefert (s. Abb. 1.2). Das am besten charakterisierte kostimulatorische Molekül ist CD28. Die Bindung an seine Liganden B7.1 (CD80) und/ oder B7.2 (CD86) auf der APZ bewirkt gemeinsam mit der TZR-Bindung eine erhöhte Produktion des Botenstoffs Interleukin (IL)-2, welche die klonale Expansion der T-Lymphozyten erst ermöglicht (Coyle and Gutierrez-Ramos, 2001).

Neben CD28 gibt es noch andere Mitglieder der CD28-Familie, wie z.B. CTLA-4 (zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4, CD152) und ICOS (engl.: inducible co-stimulator). Während CD28 konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, erfolgt die Expression von CTLA-4 erst nach der T-Zellaktivierung. CTLA-4 ist allerdings nicht an der Aktivierung naiver T-Zellen beteiligt, sondern vermittelt inhibitorische Signale für die T-Zell-Proliferation, die IL-2 Produktion und die Progression im Zellzyklus und hat negative

regulatorische Funktionen (Egen et al., 2002; Sharpe and Freeman, 2002). Auch ICOS wird im Wesentlichen von aktivierten und nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert und vermittelt über die Interaktion mit seinem Liganden kostimulatorische Signale (Okazaki et al., 2002). In den ersten Studien wurde gezeigt, dass ICOS besonders effektiv bei der Induktion von IL-10 ist und an der terminalen Differenzierung von B-Zellen zu Gedächtnis- oder Plasmazellen beteiligt ist (Hutloff et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). Eine systematischere Untersuchung fand jedoch, dass das Muster der von ICOS⁺ CD4⁺ Th-Zellen produzierten Zytokine in verschiedenen murinen Infektionsmodellen variiert. Die Beteiligung von ICOS an der Kostimulation unterschiedlicher Effektorfunktionen bei verschiedenen Immunantworten ist wahrscheinlich von Faktoren wie der Natur des betreffenden Antigens, sowie der Lokalisierung und Dauer der Immunantwort abhängig (Bonhagen et al., 2003).

Weiterhin wird die Aktivierung der T-Zellen von der Bindung von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. CD2/ LFA-3(CD48) oder LFA-1/ ICAM-1, der kostimulatorischen Bindung von CD40Ligand (CD40L, CD154)/ CD40 und dem Glykoprotein HSA (engl.: heat stable antigen, CD24) beeinflusst (Watts and DeBenedette, 1999). Daneben sind noch eine Reihe anderer kostimulatorischer Moleküle wie 4-1BB(CD137) und Ox40(CD134) an der T-Zellaktivierung beteiligt (Watts and DeBenedette, 1999).

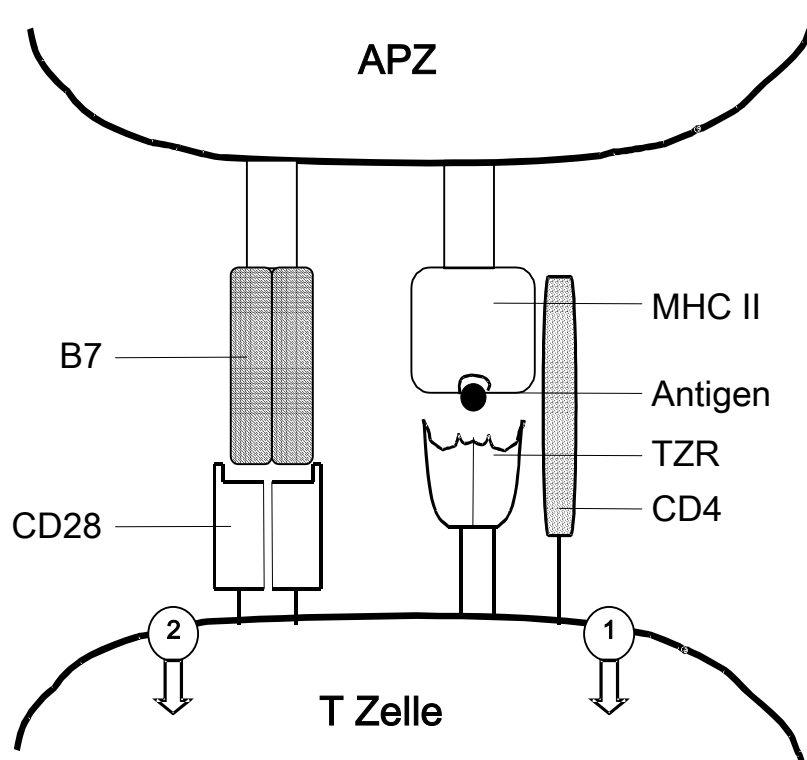


Abb. 1.2: T-Zellaktivierung - Signal 1 und 2. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen bei der Aktivierung von CD4⁺-Klasse-II-restringierten T-Zellen. Eine vollständige Aktivierung der naiven T-Zellen erfolgt nach Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TZR (Signal 1) und Interaktion von kostimulatorischen Molekülen (Signal 2, z.B. Bindung von B7 auf einer APZ an CD28 auf der T-Zelle).

Nach der Aktivierung naiver, also antigenunerfahrener, Th-Zellen durch Signale über den TZR und kostimulatorische Moleküle, geht die ruhende naive Zelle aus der G_0 in die G_1 Phase des Zellzyklus über (Swain, 1999). Einige charakteristische Merkmale für diesen Übergang sind eine erhöhte Zellgröße und die Expression sogenannter aktivierungsinduzierter Oberflächenmoleküle. Dazu gehören, neben dem bereits erwähnten ICOS, unter anderem CD69, CD44, CD154 (CD40L), CD25 sowie CD134 (Ox40). CD69 ist ein C-Typ Lektin, dessen Expression sehr früh nach der T-Zell-Aktivierung erfolgt (Ziegler et al., 1994). Seine Funktion konnte bislang nicht geklärt werden. CD44 wird von Th-Zellen nach Aktivierung und sehr stark von Gedächtniszellen exprimiert (Budd et al., 1987; MacDonald et al., 1990). CD154 ist ein akzessorisches Molekül, welches von aktivierten Th-Zellen hergestellt wird und eine wichtige Rolle bei kostimulatorischen Interaktionen mit APZ spielt (Noelle et al., 1992; Roy et al., 1993). CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors und wird von Th-Zellen nach ihrer Aktivierung verstärkt exprimiert (Malek et al., 1985). CD134 wird auf aktivierten $CD4^+$ T-Zellen exprimiert und besitzt kostimulatorische Funktionen (Watts and DeBenedette, 1999; Weinberg et al., 1998). Die Expression anderer Oberflächenmoleküle nimmt nach Aktivierung der Zelle ab. So wird beispielsweise CD62L (L-Selektin), ein Leukozytenadhäsionsmolekül, welches die Migration in lymphatische Gewebe wie Lymphknoten vermittelt, stark auf der Oberfläche naiver rezirkulierender Th-Zellen exprimiert. Die Expression von CD62L wird nach Aktivierung der Th-Zelle rasch herunterreguliert (Jung et al., 1988; Kishimoto et al., 1989). Mit Hilfe solcher Oberflächenmoleküle kann der Aktivierungszustand einer Th-Zelle beschrieben werden.

Die aktivierten T-Zellen üben unterschiedliche Effektorfunktionen aus. $CD8^+$ T-Zellen werden nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL), welche ihre Zielzellen über verschiedene Mechanismen lysieren, wenn diese das entsprechende Antigen über MHC-I präsentieren. Die aktivierten $CD4^+$ T-Helfer-Zellen differenzieren zu unterschiedlichen Effektorpopulationen und modulieren und regulieren über die Sekretion von Zytokinen, sowie über die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle die entstehende Immunantwort.

1.4 Differenzierung von Th-Zellen

1.4.1 Th-Subpopulationen

Eine antigenunerfahrene naive Th-Zelle sezerniert innerhalb von Stunden nach ihrer Aktivierung durch Antigenerkennung und Kostimulation den Wachstumsfaktor IL-2. Gleichzeitig wird die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf der Oberfläche exprimiert, so dass das sezernierte IL-2 als auto- und parakriner Faktor die Proliferation und somit die klonale Expansion der Th-Zellen unterstützt (Smith, 1988). Die Fähigkeit zur Sekretion von Effektorzytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, Interferon (IFN)- γ oder Tumornekrosefaktor

(TNF)- β , wird jedoch erst nach Aktivierung durch weitere Signale, häufig ebenfalls Zytokine, induziert (Paul and Seder, 1994).

An den Überständen klonierter Th-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass viele Zytokine nicht zufällig verteilt, sondern in bestimmten Mustern gemeinsam sezerniert werden (Mosmann et al., 1986; Mosmann and Coffman, 1989). Aus dieser Beobachtung wurde ein Konzept abgeleitet, nach dem $CD4^+$ Th-Zellen in zwei Klassen eingeteilt werden. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , TNF- β (Lymphotoxin) und IL-2, aber nicht IL-4, IL-5 oder IL-6. Dagegen exprimieren Th2-Zellen überwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13, jedoch nicht IL-2 oder IFN- γ (Mosmann et al., 1986; Mosmann and Coffman, 1989). IL-2 ist indessen kein charakteristisches Zytokin von Th1-Zellen, da naive $CD4^+$ Th-Zellen und Th0-Zellen (s.u.) ebenfalls IL-2 nach einer Stimulierung mit Antigen produzieren (O'Garra, 1998). IL-10 wurde lange Zeit zu den Th2-Zytokinen gezählt. Es kann aber auch von IFN- γ produzierenden und anderen Th-Zellen gebildet werden. Zytokine wie IL-3, TNF- α und GM-CSF (engl.: granulocyte-monocyte colony-stimulating factor) können von beiden Th-Populationen gebildet werden.

Hinzukommend werden bei der Maus und beim Menschen als Th0-Zellen solche Th-Zellen bezeichnet, welche gleichzeitig Zytokine beider Klassen, also sowohl IL-4 als auch IFN- γ , bilden (Firestein et al., 1989; Kelso and Gough, 1988). Es ist noch unklar, ob Th0-Zellen ein Vorläuferstadium für weiter differenzierte Th-Zellen oder eine separate, stabil polarisierte Population darstellen (Kamogawa et al., 1993). Auf der Grundlage ihrer Zytokinproduktion wurden außerdem transforming growth factor (TGF)- β produzierende Th3-Zellen mit unterdrückenden regulatorischen Funktionen beschrieben (Chen et al., 1994). Es wurde gezeigt, dass Th3-Zellen in der Maus nach oraler Antigengabe entstehen und die Entstehung autoimmuner Pathologien in verschiedenen Mausmodellen verhindern können. Daneben gehören zu den sogenannten regulatorischen Th-Zellen (Treg) auch $CD4^+$ $CD25^+$ und CTLA- 4^+ Th-Zellen, die aus unmanipulierten Mäusen gewonnen werden können und ebenfalls unterdrückend wirkende regulatorische Funktionen besitzen (Sakaguchi et al., 1995; Takahashi et al., 1998; Takahashi et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass $CD4^+$ $CD25^+$ Treg-Zellen auch in humanen T-Zellen durch Kultur mit TGF- β angereichert werden können (Yamagiwa et al., 2001). Die Mechanismen, mit denen Treg-Zellen Immunantworten regulieren bzw. unterdrücken, sind noch nicht vollständig geklärt und bisherige Ergebnisse variieren abhängig vom verwendeten experimentellen Modell oder Aufbau (Shevach, 2002). Eine weitere Th-Effektorzellpopulation, welche den Chemokinrezeptor CXCR-5 exprimiert und insbesondere B-Zellhilfe in den Follikeln der Keimzentren vermittelt, wurde ebenfalls in Mäusen beschrieben und T_{FH} (engl.: follicular B helper T-cell) benannt (Breitfeld et al., 2000; Mackay, 2000; Schaerli et al., 2000).

Obwohl funktionelle und phänotypische Unterschiede bestehen, entwickeln sich die verschiedenen Th-Populationen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Kamogawa et al., 1993). Die Differenzierung zu polarisierten Subpopulationen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Die Natur des Antigens, seine Menge und sein Eintrittsweg können die Signale über den TZR modulieren, welche entscheidend bei der Entwicklung einer bestimmten Th-Effektorpopulation sein können. Die Art der APZ und die Weise der Kostimulation beeinflussen ebenfalls den Werdegang sich differenzierender Th-Zellen (Constant and Bottomly, 1997; Salomon and Bluestone, 2001; Sperling and Bluestone, 2001). Es ist jedoch das Zytokinmilieu, in welchem sich die differenzierende Th-Zelle befindet, welches hauptsächlich ihr Schicksal bestimmt.

1.4.2 Polarisierung durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren

Der entscheidende Faktor für die Th2-Differenzierung ist IL-4. Die mit dem IL-4 Rezeptor (IL-4R) assoziierten Januskinasen Jak1 und Jak3 phosphorylieren nach Ligandenbindung das Signaltransduktionsmolekül STAT-6 (engl.: signal transducer and activator of transcription-6), welches dimerisiert und in den Nukleus transloziert, wo es die Regulierung verschiedener Zielgene vermittelt (Hsieh et al., 1993; Seder et al., 1992; Swain et al., 1990). Durch Untersuchungen an IL-4-, IL-4R- oder STAT-6-defizienten Mäusen, die stark eingeschränkte Th2-Antworten mit verminderter Zytokin- und IgE-Produktion aufweisen, konnte die zentrale Bedeutung dieser Moleküle für die Th2-Differenzierung belegt werden (Kaplan et al., 1996a; Kuhn et al., 1991; Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass sich auch in Abwesenheit von IL-4/STAT-6 Signalen Th2-Zellen entwickeln, die jedoch eine verminderte Anzahl und Zytokinsekretion aufweisen (Finkelman et al., 2000; Jankovic et al., 2000). In Infektionsmodellen mit den Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* oder *Schistosoma mansoni* in IL-4 defizienten Mäusen vermittelte die verbliebene Th2-Zytokinsekretion, überwiegend durch das Th2-Zytokin IL-13, protektive oder immunpathologische Effekte (Chiaromonte et al., 1999; Jankovic et al., 1999; Urban et al., 1998). Dennoch hat IL-4 eine unbestrittene entscheidende Funktion bei der phänotypischen Th2-Entwicklung. STAT-6 defiziente Mäuse zeigen nach einer helminthischen Infektion nicht nur eine verminderte Anzahl Th2-Zellen, sondern auch eine vergrößerte Population Th1-Zellen, die unabhängig von IL-12 zu sein scheint (Jankovic et al., 2000).

Durch STAT-6 wird die Expression des Th2 spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 induziert. Naive Th-Zellen exprimieren nur geringe Mengen des Zinkfingerproteins GATA-3, aktivierte Th2-Zellen haben dagegen eine hohe GATA-3 Expression (Ouyang et al., 1998). GATA-3 scheint eine Schlüsselposition bei der Regulierung der Th2-Differenzierung einzunehmen. Eine ektope Expression von GATA-3 vermittelt eine Th2-Differenzierung unter Bedingungen, welche ansonsten zu einer Th1-Polarisierung führen (Ferber et al., 1999;

Ouyang et al., 1998; Zheng and Flavell, 1997). Der Expression von GATA-3 folgt die Induktion des Transkriptionsfaktors c-maf, der ebenfalls bevorzugt von Th2-Zellen gebildet wird und ein starker, IL-4 Gen spezifischer Aktivator ist (Ho et al., 1996; Kim et al., 1999). GATA-3 fördert außerdem direkt die Expression von IL-4, IL-5 und IL-13 und reguliert die Expression des IL-12 Rezeptors (IL-12R) herunter (Zhang et al., 1999). Als Folge davon entwickeln sich Th2-Zellen mit einem stabilen Phänotyp.

T-bet, ein Mitglied der T-box Familie von Transkriptionsfaktoren, scheint eine zu GATA-3 analoge Rolle bei der Th1-Differenzierung zu spielen. Die ektope Expression von T-bet in sich entwickelnden Th2-Zellen fördert eine stabile Th1-Differenzierung mit IFN- γ Produktion und verhindert die Th2-Differenzierung (Szabo et al., 2000). T-bet induziert die Expression der IL-12R β 2-Untereinheit (IL-12R β 2) und stabilisiert seine eigene Expression entweder über eine intrinsische autokatalytische Schleife und/ oder den autokrinen Effekt des IFN- γ Signalwegs, der über STAT-1 die Expression von T-bet induziert (Afkarian et al., 2002; Mullen et al., 2001). Der IL12R wird nicht von naiven Th-Zellen exprimiert, die Expression von IL-12R β 1 und IL-12R β 2 erfolgt jedoch unmittelbar nach Aktivierung (Igarashi et al., 1998; Murphy, 1998; Szabo et al., 1997). Die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor auf der Oberfläche aktivierter Th-Zellen führt über die Aktivierung des Signaltransduktionsmoleküls STAT-4 zur Induktion der IFN- γ Expression und einer Th1-Entwicklung (Wurster et al., 2000). Die Bedeutung von IL-12 und STAT-4 konnte mit Hilfe von Mäusen gezeigt werden, die defizient für IL-12, IL-12R oder STAT-4 sind und stark eingeschränkte Th1-Antworten mit verminderter IFN- γ Produktion bilden (Kaplan et al., 1996b; Magram et al., 1996; Trinchieri, 1998). Daneben existieren weitere Moleküle, die eine Th1-Differenzierung fördern. Dazu gehören IL-18, IL-23 und IL27. IL-27 bindet an TCCR (engl.: T-cell cytokine receptor, auch WSX-1 genannt) und führt zur klonalen Expansion naiver jedoch nicht von Gedächtnis Th-Zellen und fördert in Synergie mit IL-12 die IFN- γ Produktion naiver Th-Zellen (Pflanz et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass TCCR defiziente Mäuse beeinträchtigte Th1-Antworten und damit eine behinderte Eliminierung der intrazellulären Pathogene, *Listeria monocytogenes* und *Leishmania major* aufweisen (Chen et al., 2000; Yoshida et al., 2001). IL-12 induziert die Expression des IL-18 Rezeptors (IL-18R) (Afkarian et al., 2002). IL-18 vermittelt in Synergie mit IL-12 Signale über NF κ B, p38MAPK und GADD45, die zu einer gesteigerten IFN- γ Produktion differenzierter Th1-Zellen führen (Lu et al., 2001; Robinson et al., 1997; Yang et al., 2001). In Abwesenheit von IL-12, fördert IL-18 jedoch eine Th2-Entwicklung (Yoshimoto et al., 2000). IL-1 α wirkt ebenfalls als Kofaktor mit IL-12 bei der Induktion einer Th1-Differenzierung in naiven Th-Zellen (Robinson et al., 1997). Ein weiteres gemeinsam mit IL-12 wirkendes Zytokin ist IL-23, welches jedoch nicht auf naive sondern selektiv auf die Proliferation und IFN- γ Produktion von Gedächtnis Th-Zellen wirkt (Oppmann et al., 2000). Während lange Zeit nur IL-12 als instruierender Faktor für die Th1-

Differenzierung galt, geht man nun davon aus, dass sowohl über IL-12 als auch über IFN- γ wichtige Signale für die Entstehung von Th1-Antworten übermittelt werden (Neurath et al., 2002). Bei diesem Modell erfolgt in naiven Th-Zellen durch Signale von IFN- γ über STAT-1 bei gleichzeitigen TZR-Signalen die Erhöhung der Expression von T-bet. Dadurch wird die Expression des IL-12R induziert. IL-12 verstärkt wiederum die Th1-Antwort durch direkte Erhöhung der IFN- γ Produktion und durch Induktion der IL-18R Expression, wodurch wiederum ein alternativer Weg für die IFN- γ Produktion eröffnet wird. Nicht eindeutig geklärt ist der Beitrag der IL-12-Kofaktoren IL-27 und IL-1 α für die Th1-Induktion und von IL-23 für die Stabilisierung. Abb. 1.3 fasst den Einfluss verschiedener Zytokine auf die Differenzierung naiver Th-Zellen sowie die charakteristischerweise produzierten Zytokine und Eigenschaften der generierten Effektorzellen zusammen.

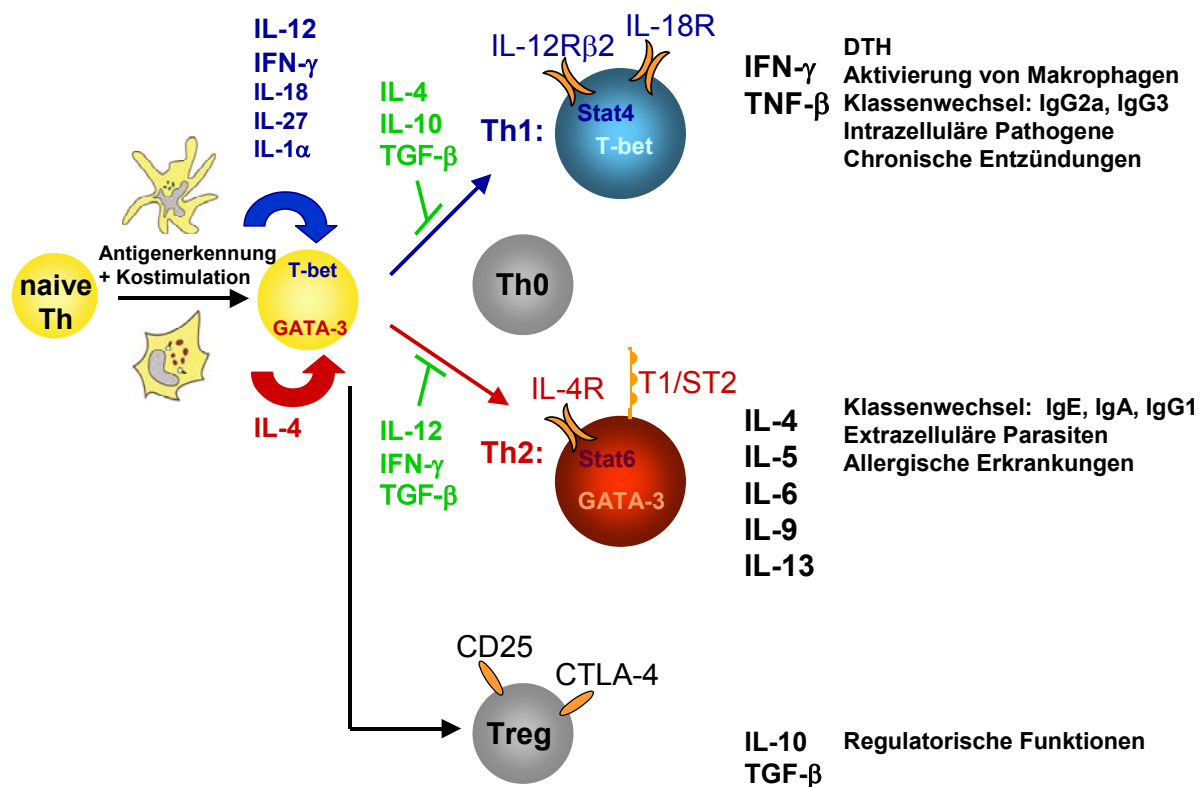


Abb. 1.3: Differenzierung, Eigenschaften und Effektorfunktionen von Th-Zellen. Nach ihrer Aktivierung durch APZ über Antigenpräsentation und gleichzeitige Kostimulation differenziert die naive Th-Zelle zu einer Th-Zelle mit Effektorfunktionen. IL-12, IFN- γ und IL-4 aktivieren unterschiedliche STAT-Proteine und Transkriptionsfaktoren in aktivierten Th-Zellen und induzieren die Differenzierung zu Th1- oder Th2-Subpopulationen mit dem jeweiligen charakteristischen Zytokinexpressionsmuster. Zytokine mit jeweils inhibitorischem Effekt sind ebenfalls eingezeichnet (grün). Eine Th1-Differenzierung wird durch IL-4, IL-10 und TGF- β inhibiert, während IL-12, IFN- γ und TGF- β die Entwicklung von Th2-Zellen blockieren. Th1-Zellen sind an DTH-Reaktionen und entzündlichen Prozessen beteiligt und vermitteln den Schutz vor intrazellulären Pathogenen. Th2-Zellen unterstützen humorale B-Zell-Antworten und sind notwendig für die Beseitigung extrazellulärer Parasiten. Daneben existieren Th0-Zellen, welche gleichzeitig Th1- und Th2-Zytokine produzieren, sowie Treg-Zellen mit regulatorischen Funktionen.

1.4.3 Stabilisierung durch epigenetische Modifikationen

Während ihrer Polarisierung wird der Phänotyp der sich differenzierenden Th-Populationen durch epigenetische Modifikationen stabilisiert. Die Transkription eines bestimmten Gens erfordert seine Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und Enzyme. Gene, welche im dicht gepackten, stark kondensierten Heterochromatin liegen, sind meist inaktiv. In naiven Th-Zellen befinden sich die Zytokingene im dekontensierten und dadurch für die Transkription leichter zugänglichen Euchromatin. Nach wiederholter Aktivierung unter Th1 polarisierenden Bedingungen ist das nichtexprimierte IL-4 Gen bei der Mehrheit der Th-Zellen im Heterochromatin lokalisiert, wodurch es weniger zugänglich für die Transkription ist. Andererseits befindet sich das IFN- γ Gen bei den meisten Th1-Zellen im Euchromatin und wird exprimiert. Umgekehrt liegt bei stabil polarisierten Th2-Zellen das nichtexprimierte IFN- γ Gen überwiegend im Heterochromatin und das exprimierte IL-4 Gen nicht (Grogan et al., 2001). Die geänderte physikalische Lokalisation der betreffenden Zytokingene ins Heterochromatin trägt auf diese Weise zur Verhinderung ihrer Expression und somit zur Stabilisierung des entsprechenden Th-Phänotyps bei.

Änderungen in der Anzahl DNase I hypersensitiver Stellen (DH-Stellen) sind ein weiterer Faktor, der zur Stabilisierung des gebildeten Phänotyps beiträgt. DH-Stellen werden bereits durch sehr geringe Konzentrationen des Enzyms DNase I gespalten und markieren Stellen mit gestörter Struktur oder Fehlen der Nukleosomen, meist verursacht durch die Bindung von Proteinen an benachbarte DNA-Elemente. Bei naiven Th-Zellen weist der IL-4/ IL-13 Genloкус zwei DH-Stellen auf. Innerhalb von 48 Stunden nach Aktivierung und Differenzierung zu Th2-Zellen erscheinen 10 weitere DH-Stellen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die zusätzlichen DH-Stellen eine verstärkte IL-4 Expression und die Th2-Spezifität vermittelt werden (Agarwal and Rao, 1998; Lee et al., 2001). Nach der Differenzierung naiver muriner CD4⁺ T-Zellen treten im IFN- γ Lokus zwei zusätzliche DH-Stellen auf. Der Transkriptionsfaktor NFAT-1, der sowohl in Th1- als auch in Th2-Nuklei vorkommt, bindet nur in stimulierten Th2-Zellen an den Promoter und den 3' Enhancer des IL-4 Gens. Andererseits bindet NFAT-1 nur in stimulierten Th1-Zellen an den IFN- γ Promotor (Agarwal et al., 2000). Durch epigenetische Modifikation erhält somit ein allgemeiner Transkriptionsfaktor je nach Zelltyp Zutritt zu regulatorischen Elementen im Chromatin bestimmter Zytokingene. Die Faktoren, welche zur Bildung von DH-Stellen in den IL-4/ IL-13 und IFN- γ Loci führen, konnten bislang nicht identifiziert werden.

Die Differenzierung der Th-Zellen wird hinzukommend von Änderungen in der Methylierung von CpG-Motiven begleitet. Es ist bekannt, dass stumme Gene, die nicht transkribiert werden, hypermethyliert sind. Dagegen sind aktive Gene stark demethyliert (Knippers). 4-7 Tage nach Polarisierung naiver CD4⁺ T-Zellen wird das IFN- γ Gen bei Th1-Zellen bzw. werden die IL-4/ IL-5/ IL-13 Gene bei Th2-Zellen demethyliert (Bird et al., 1998; Mullen et al.,

2002). Der Mechanismus, durch den die Demethylierung der Zytokingene während der Th-Differenzierung erfolgt, ist bislang noch nicht verstanden. Aktive Demethylierung könnte durch Demethylasen oder durch lokale Inhibition der Methyl-Transferasen erfolgen. Der Verlust der CpG Methylierung trägt zur Fähigkeit endgültig differenzierter Th1- bzw. Th2-Zellen bei, die Kompetenz für die Aktivierung des IFN- γ respektive IL-4 Gens klonal zu vererben.

Der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus ist notwendig, um eine optimale Expression von Effektorzytokinen wie IL-4 oder IFN- γ zu erreichen (Richter et al., 1999). Th-Zellen verlieren nach 3-5 Zellteilungen unter polarisierenden Bedingungen die Fähigkeit, der Polarisierung entgegengesetzte Zytokine zu produzieren (Grogan et al., 2001). Die Einführung von DH-Stellen und passive DNA-Demethylierung sind vom Zellzyklus abhängige Prozesse und tragen zur Stabilisierung des sich ausbildenden Th-Phänotyps bei.

1.4.4 Funktion von Th1- und Th2-Zellen

Die Th1- und Th2-Subpopulationen haben unterschiedliche Aufgaben. Th1-Zellen vermitteln zelluläre, inflammatorische Immunreaktionen. In den meisten Fällen stimulieren sie antigenträgende Makrophagen zu Erhöhung ihrer antibakteriellen und inflammatorischen Aktivität. Über die Sekretion von IFN- γ regen sie phagozytierende Makrophagen zur Produktion von IL-12, dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α und von Stickstoffmonoxid (NO) an. Über NO können Makrophagen intrazelluläre Erreger direkt eliminieren, während IL-12 die IFN- γ Produktion der Th-Zellen in einem positiven Rückkopplungsmechanismus anregt (Sher and Coffman, 1992; Trinchieri, 1995). Th1-Zellen bewirken neben der Aktivierung von Makrophagen auch die klonale Expansion von ZTL und den Klassenwechsel zu Komplement fixierenden und opsonisierenden IgG-Isotypen (Abbas et al., 1996; Murphy et al., 2000; O'Garra, 1998). Th1-Zellen spielen eine Rolle bei DTH (engl.: delayed type hypersensitivity)-Reaktionen und werden zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, wie Viren, intrazellulären Bakterien und anderen Parasiten, benötigt. Sie sind allerdings auch mitverantwortlich für die Gewebeerstörung bei chronischen Entzündungserkrankungen und organspezifischen Autoimmunkrankheiten.

Th2-Zellen unterstützen B-Zellen, damit diese proliferieren und zu Plasmazellen differenzieren können (Parker, 1993). Dabei spielt die Wechselwirkung zwischen CD40 und CD40L eine entscheidende Rolle (Foy et al., 1996). Sie führt zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Der erste Antikörper einer Immunantwort ist immer vom IgM Isotyp. Im Verlauf einer Immunantwort wird sodann der Klassenwechsel der spezifischen Ig-Isotypen durch von Th-Zellen freigesetzte Zytokine stimuliert. Bei der Maus induziert das von Th2-Zellen freigesetzte IL-4 überwiegend den Wechsel zu IgG1 und IgE, während TGF- β einen Wechsel zu IgG2b und

IgA hervorruft. Ein anderes Th2-Zytokin, IL-5, steigert zusätzlich die Synthese von IgA. Th1-Zellen sind kaum in der Lage, Antikörperantworten zu initiieren. Über die Freisetzung von IFN- γ , welches bevorzugt den Wechsel zu IgG3 und IgG2a induziert, haben sie jedoch Anteil am Isotypwechsel (Janeway and Travers, 1997). Th2-Zellen regen das Wachstum und die Differenzierung von Eosinophilen und Mastzellen an und vermitteln über den von ihnen induzierten Klassenwechsel die Aktivierung dieser Zellen. Th2-Zellen sind für die Bekämpfung extrazellulärer Parasiten, beispielsweise Helminthen, notwendig. Sie spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Asthma, Atopien und allergischen Erkrankungen.

1.5 Th-Zellen und Infektionen

Obwohl die Th1/Th2-Dichotomie eine Vereinfachung der Immunantwort darstellt, ist sie zu einem zentralen Bestandteil für das Verständnis der Immunregulierung geworden und dient der Beschreibung von Immunantworten bei Allergien und verschiedenen Infektions- und Autoimmunerkrankungen. Die spezifische Immunantwort, die vom Wirtsorganismus eingeleitet wird, um eindringende Pathogene zu eliminieren, wird von zwei Parametern bestimmt (Romagnani, 1994). Zum einen von der biologischen Diversität des Pathogens und seines *in vivo* Lebensraums (extra- oder intrazellulär), welcher zu unterschiedlicher Präsentation seiner Antigene und damit zu unterschiedlicher T-Zellaktivierung führt. Zum anderen von genetischen Eigenschaften des Wirtsorganismus.

Der genetische Hintergrund einer Maus beeinflusst die von ihr erzeugte Immunantwort auf Pathogene und ihre Suszeptibilität für autoimmune Erkrankungen. So tendieren beispielsweise Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c eher zu Th2-Immunantworten, während Mäuse des Stammes C57BL/6 eher zu Th1-Antworten neigen. Bei der Infektion von Mäusen mit dem intrazellulären Protozoon *Leishmania major* bilden BALB/c Mäuse eine für diese Infektion ineffektive humorale Th2-Antwort (IL-4 Produktion) aus und sterben, während C57BL/6 Mäuse eine zelluläre Th1-Antwort (IFN- γ Produktion) generieren und die Infektion erfolgreich bekämpfen (Liew, 1989; Reiner and Locksley, 1995). Die Suszeptibilität der BALB/c Mäuse für eine Infektion mit *L. major* liegt am Verlust der Fähigkeit, auf die Infektion eine IL-12 induzierte Th1-Antwort zu entwickeln (Guler et al., 1996). Die Behandlung resistenter Stämme, wie B10.D2 oder C3H, mit anti-IFN- γ führt zu einer Verhinderung der Th1-Antwort, so dass diese Mäuse suszeptibel werden. Andererseits können suszeptible BALB/c Mäuse durch Blockade der Th2-Differenzierung mittels Behandlung mit anti-IL-4 Antikörpern vor einer Infektion mit *L. major* geschützt werden (Abbas et al., 1996). Die Entwicklung einer proinflammatorischen Th1-Antwort, die sich durch die Produktion von IFN- γ auszeichnet, überwiegt auch bei der Immunantwort gegen Viren und andere intrazelluläre Pathogene. Dagegen führen Infektionen mit extrazellulären Nematoden zu Th2-Antworten. In

der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Infektionsmodelle mit unterschiedlichen Erregern verwendet, welche hauptsächlich entweder Th1- oder Th2-Immunantworten induzieren und im Folgenden kurz eingeführt werden.

1.5.1 Infektion mit *Toxoplasma gondii*

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Einzeller (Protozoon) der Ordnung Coccidia. Die Infektion von Mäusen mit *T. gondii* hat sich zu einem wichtigen Modell entwickelt, um die Grundlagen der protektiven Immunität gegen intrazelluläre Pathogene und die Regulierung immunpathologischer Veränderungen aufzuklären, die von solchen Erregern hervorgerufen werden. *T. gondii* existiert in drei Formen: dem Trophozoit oder Tachyzoit, der Zyste und der Oozyste oder Bradyzoit. Die sexuellen Stadien von *T. gondii* sind wirtsspezifisch und finden ausschließlich in Katzen statt. In einem asexuellen Stadium des Lebenszyklus von *T. gondii* werden allerdings auch zahlreiche andere Vertebraten meist über den oralen Weg durch den Gastrointestinaltrakt als Zwischenwirte infiziert.

Der Gastrointestinaltrakt gehört neben dem respiratorischen und dem Urogenitalsystem zum mukosalen Immunsystem. Das darmassoziierte lymphatische Gewebe besteht aus den Peyer'schen Plaques (PP), den mesenterischen Lymphknoten (mesLN) und einer großen Anzahl lymphatischer Zellen, welche sich über die Lamina Propria (LPL: Lamina Propria Lymphozyten) sowie das Epithel des Darms (IEL: intraepitheliale Lymphozyten) verteilen. Die LPL und IEL stellen die Effektorseite mukosaler Antworten dar. Obwohl sie nur von einer dünnen Schicht voneinander getrennt sind, handelt es sich bei Epithel und Lamina Propria um sehr unterschiedliche Kompartimente des Immunsystems. Die Lamina Propria enthält die meisten Komponenten des Immunsystems, mit einer großen Anzahl B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, sowie $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Die IEL befinden sich zwischen den Epithelzellen in der Nähe der Basalmembran (Mowat and Viney, 1997). Mehr als 90% der IEL sind T-Zellen, wovon die Mehrheit (ca. 80%) $CD8^+$ T-Zellen sind, von denen wiederum ca. 90% das $CD8\alpha\alpha$ Homodimer exprimieren im Unterschied zum $CD8\alpha\beta$ Heterodimer auf peripheren $CD8^+$ T-Zellen (Guy-Grand et al., 1991; Guy-Grand and Vassalli, 1993; Lefrancois, 1991).

In der Natur gehören Mäuse zu den hauptsächlichen Zwischenwirten von *T. gondii* und der Lebenszyklus des Parasiten in Mäusen ist dem im Menschen sehr ähnlich. Schon eine Stunde nach oraler Aufnahme befinden sich Parasiten im Epithel und der Lamina Propria des Dünndarms. Nach Infektion von Darmepithelzellen reift die infektiöse Form von *T. gondii* (Bradyzoiten) zu Tachyzoiten, die sich rasch in der Zelle vermehren. Dann bricht die Plasmamembran und der Parasit wird ins extrazelluläre Milieu entlassen, wo er so gut wie alle kernhaltigen Zellen infizieren kann und sich über intrazelluläre Replikation weiter ausbreitet (Denkers and Gazzinelli, 1998). 24 Stunden nach oraler Infektion mit Bradyzoiten sind die Einzeller in den mesenterischen Lymphknoten und weitere 24 Stunden später

beginnt vermutlich die Ausbreitung in andere Gewebe über das Blut oder das lymphatische System. Vier Tage nach der Infektion kann *T. gondii* im Blut, der Lunge und der Leber gefunden werden (Liesenfeld, 1999). Nach Entwicklung einer starken zellvermittelten Immunantwort werden die Tachyzoit-Stadien aus den Wirtsgeweben entfernt, während Bradyzoiten, die sich langsam vermehrende und harmlosere Form des Parasiten, persistieren (McLeod et al., 1988). Die Bradyzoiten überleben innerhalb von Zysten und werden durch die Zystenwand, die hauptsächlich aus Wirtsprodukten zusammengesetzt ist, effektiv vor dem Immunsystem des Wirts geschützt (Denkers and Gazzinelli, 1998).

Die Immunantwort wird sowohl von $CD4^+$ als auch von $CD8^+$ Lymphozyten vermittelt (Gazzinelli et al., 1992; Gazzinelli et al., 1991; Khan et al., 1994; Suzuki and Remington, 1988). So gut wie alle Mausstämme entwickeln eine starke Th1-Immunantwort gegen *T. gondii*, unabhängig von einem suszeptiblen oder resistenten MHC-Haplotyp (Gazzinelli et al., 1992; Gazzinelli et al., 1991). Inzuchtstämme des H-2^b Haplotyps, wie z.B. C57BL/6 sind sehr suszeptibel, Stämme des H-2^d Haplotyps nicht (Liesenfeld et al., 1996; McLeod et al., 1989; McLeod et al., 1984). Der erste Kontakt von *T. gondii* mit dem Immunsystem induziert rasch die Produktion von IL-12 durch eine Subpopulation dendritischer Zellen (Yap and Sher, 1999). Dadurch werden NK- und T-Zellen aktiviert und zur Synthese von IFN- γ angeregt. Die Synthese von IL-2 durch $CD4^+$ Th-Zellen führt unter anderem zu einer verstärkten Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen (Denkers and Gazzinelli, 1998).

1.5.2 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ist das am besten charakterisierte Infektionsmodell für intrazelluläre, bakterielle Krankheitserreger. *L. monocytogenes* ist ein anaerobes, gram-positives und fakultativ intrazelluläres Bakterium. Nach oraler Aufnahme gelangt *L. monocytogenes* über den Magen in den Dünndarm und breitet sich von hier innerhalb weniger Stunden auch ins Caecum und in den Dickdarm aus. In allen Darmabschnitten kann dann eine massive Bakterienreplikation beobachtet werden (Havell et al., 1999). Nach der Translokation durch die Darmmukosa breiten sich die Listerien über Blut und Lymphe in tiefere Gewebe aus und erreichen als wichtigste Zielorgane Milz und Leber. Die Infektion von Mäusen führt schließlich zu einer starken, gegen *L. monocytogenes* gerichteten Immunantwort. Bereits nach vier bis fünf Tagen kann eine spezifische T-Zell Antwort nachgewiesen werden. Die Folge dieser T-Zell Antwort ist eine deutliche Reduktion der Listerien-Titer und schließlich, ab etwa Tag zehn nach Beginn der Infektion, die vollständige Eliminierung der Bakterien aus dem Organismus (Kaufmann, 1993).

Durch die besondere Lebensweise von *L. monocytogenes* im Zytosol der infizierten Zellen findet eine verstärkte Prozessierung und Präsentation von Listerien-Antigenen über den MHC-Klasse-I-Weg statt. Die Konsequenz ist eine starke Induktion von gegen Listerien-Antigene gerichteten $CD8^+$ T-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und der Klärung

sowohl primärer als auch sekundärer Infektionen mit *L. monocytogenes* haben (Brunt et al., 1990; Kaufmann, 1993).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Listerien-Proteine charakterisiert, die im Verlauf einer *L. monocytogenes*-Infektion von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. In den meisten Fällen wurden auch die genaue Größe und Sequenz der erkannten Peptide ermittelt. Für durch MHC-Klasse-Ia präsentierte Listerien-Antigene liegen gute Analysen für den Mausstamm BALB/c vor. In diesen Mäusen konnten immunodominante Peptide für die Proteine Listeriolysin (LLO), p60 und mpl charakterisiert werden (Busch et al., 1997; Geginat et al., 2001; Pamer, 1994; Pamer et al., 1991; Sijts et al., 1996). Die Identifizierung von Listerien-Epitopen erlaubte die nähere Analyse der gegen diese Epitope gerichteten CD8⁺ T-Zell Antwort. Mit Hilfe von löslichen MHC Klasse I/Peptid-Komplexen (MHC Klasse I-Tetramere) konnte die spezifische CD8⁺ T-Zell Antwort quantitativ charakterisiert werden. Nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* expandiert die spezifische CD8⁺ T-Zell Population deutlich und erreicht zwischen den Tagen 7 und 9 der Primärinfektion ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt sind etwa 5% der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für das dominante Peptid LLO₉₁₋₉₉. Anschließend sinkt die Frequenz rasch ab und erreicht nach 3 bis 4 Wochen eine Gedächtniszell-Frequenz von deutlich unter 0,5%. Die Sekundärantwort zeichnet sich durch eine beschleunigte Kinetik und deutlich höhere Frequenzen aus. An den Tagen 5 bis 7, dem Zeitpunkt der maximalen T-Zell-Antwort, wurden für LLO₉₁₋₉₉ spezifische CD8⁺ T-Zellen Frequenzen von etwa 15% gemessen (Busch et al., 1998).

Die starke Entzündungsreaktion und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen während der *L. monocytogenes*-Infektion fördern die Differenzierung von aktivierten CD4⁺ Th-Zellen zu Th1-Zellen (Hsieh et al., 1993; Kaufmann, 1993). Die Bedeutung der gegen *L. monocytogenes* gerichteten CD4⁺ T-Zell-Antwort war lange umstritten und wird zum Teil immer noch kontrovers diskutiert (North et al., 1997). Die Analyse von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen belegt aber eindeutig, dass Th-Zellen zum Schutz gegen *L. monocytogenes* beitragen. MHC-Klasse-II-defiziente Mäuse, denen ein Großteil der CD4⁺ Th-Zellen fehlt, besitzen eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber Listerien-Infektionen, und MHC-Klasse-I-defiziente Mäuse zeigen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen noch einen durch T-Lymphozyten vermittelten Schutz, der zum großen Teil auf CD4⁺ Th-Zellen beruht. Im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen scheinen CD4⁺ T-Lymphozyten aber von untergeordneter Bedeutung für die Kontrolle von *L. monocytogenes* zu sein (Kaufmann and Ladel, 1994; Ladel et al., 1994).

1.5.3 Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Infektionen mit Nematoden wie beispielsweise *N. brasiliensis* führen zu Th2-Antworten mit Eosinophilie, erhöhten IgE-Mengen und mukosaler Mastozytose (Finkelman et al., 1997; Urban et al., 1992). *N. brasiliensis* ist ein Nematode, der natürlicherweise Ratten befällt. Für

experimentelle Studien wurde ein Stamm an Mäuse angepasst (Colwell and Wescott, 1973). Larven im L3 Stadium eines angepassten Stamms von *N. brasiliensis* infizieren Mäuse über die Haut und wandern in die Lunge, wo sie eine entzündliche Immunantwort hervorrufen, die durch pulmonare eosinophile Granulome gekennzeichnet ist (Ogilvie and Hockley, 1968). Die protektive Immunität gegen *N. brasiliensis* wird von CD4⁺ T-Zellen vermittelt, was durch Studien in nude und RAG^{-/-} Mäusen und Mäusen, die mit depletierenden anti-CD4 Antikörpern behandelt wurden, gezeigt werden konnte (Katona et al., 1988; Prowse et al., 1978; Urban et al., 1995). Die Infektion mit diesem parasitären Ringelwurm führt zu einer starken Immunantwort, welche vor allem durch von Th2-Zellen gebildetes IL-13 vermittelt wird (McKenzie et al., 1998a; McKenzie et al., 1998b). So zeigen IL-4 defiziente Mäuse eine normale Elimination von *N. brasiliensis* (Finkelman et al., 1997; Kopf et al., 1993). Die erfolgreiche und effiziente Bekämpfung der *N. brasiliensis* Infektion erfordert die Anwesenheit von IL-13, IL-4R α und STAT-6 (Barner et al., 1998; Urban et al., 1998). Ebenso wie IL-4 aktiviert IL-13 das Signaltransduktionsmolekül STAT-6 über IL-4R α vermittelte Signale (Finkelman et al., 1999).

1.6 Th-Zellen und Autoimmunerkrankungen

Neben der Bekämpfung von Infektionen sind Th-Zellen allerdings auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Autoimmunerkrankungen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene murine Modelle für Autoimmunerkrankungen verwendet, welche im Folgenden eingeführt werden.

1.6.1 Arthritis

Bei einigen Arthritis-erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA), handelt es sich um autoimmune, vermutlich Th1 assoziierte, entzündliche Erkrankungen der Gelenke. Das Überwiegen von Th1-Zytokinen wurde bei Patienten mit RA und Lyme Arthritis beschrieben (Dolhain et al., 1996; Yin et al., 1997). Es existieren verschiedene Tiermodelle für Polyarthritis, die Übereinstimmungen mit der humanen Form von RA aufweisen. In den meisten Modellen werden die spezifischen Autoimmunreaktionen der Arthritis durch eine Immunisierung mit Knorpelantigenen ausgelöst. Ein murines Modell entwickelt spontan eine organspezifische Autoimmunreaktion gegen ein systemisches Autoantigen (Kouskoff et al., 1996). Dieses Modell ist das einzige, das eine spontane, organspezifische Autoimmunreaktion ausbildet, die viele Gemeinsamkeiten mit der humanen RA hat. Für dieses Modell konnte ein Autoantigen identifiziert werden, gegen das spezifische IgG-Antikörper produziert werden (Matsumoto et al., 1999). Dabei handelt es sich um ein Enzym, Glucose-6-Phosphatisomerase (GPI), das ubiquitär exprimiert wird und in der Zelle eine entscheidende Aufgabe im Energiestoffwechsel bei der Glykolyse hat. GPI wird nicht nur in

der Zelle exprimiert, sondern ist in geringer Konzentration auch im Serum zu finden. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit GPI als Antigen ein neues Arthritismodell etabliert. Genetisch susceptible DBA/1 Mäuse entwickeln nach subkutaner Immunisierung mit rekombinant hergestellter humaner GPI in Adjuvans eine remittierende Arthritis (Schubert et al., 2003). Die Vorder- und Hinterläufe der Tiere röten sich und schwellen stark an, mit zellulären Infiltraten und Entzündungsreaktionen. Über einen klinischen Index kann der Krankheitsgrad gewertet werden (s. 3.1.3.1). Ab einem Krankheitsgrad von 0,5 pro Lauf, ist histologisch in den geschwollenen Gelenken eine Synovitis, eine Tenosynovitis und eine Periarthritis zu erkennen. Ab einem Krankheitsgrad von 1 pro Lauf findet man zusätzlich Knochen- und Knorpeldestruktionen (Schubert et al., 2003).

1.6.2 Systemischer Lupus Erythematosus

Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Produktion verschiedener Autoantikörper und die Entwicklung einer fatalen Glomerulonephritis gekennzeichnet ist. Murine Inzucht-Modelle für SLE weisen starke serologische, histologische und zelluläre Gemeinsamkeiten mit der humanen Erkrankung auf. Es existieren drei Arten von Mausstämmen mit einer Prädisposition für eine SLE-Erkrankung, die (NZBxNZW) F₁-Hybriden, der BXSB-Stamm und der MRL/lpr -Stamm. Das MRL/lpr-Modell wird mit starker IFN- γ Expression und Th1-Zellen in Verbindung gebracht (Takahashi et al., 1996; Theofilopoulos et al., 2001; Theofilopoulos and Lawson, 1999).

MRL/lpr Mäuse haben einen gemischten Hintergrund und eine natürlich entstandene Mutation. Die *lpr* (lymphoproliferation) Mutation liegt an der Insertion von ETn (engl.: early transposable element) in das zweite Intron des *Fas* Gens (Adachi et al., 1993). Das bewirkt eine starke Reduktion der *Fas* mRNA Expression und wird klinisch mit einer stark beschleunigten SLE ähnlichen Erkrankung in Verbindung gebracht (Drappa et al., 1993). Homozygote Tiere entwickeln aufgrund der defekten Apoptose eine generelle, massive Vergrößerung der Milz (Splénomegalie) und der Lymphknoten (Lymphadenopathie), proliferative Glomerulonephritis und Autoimmunität und sterben meist in einem Alter von 5-6 Monaten. Der Spiegel zirkulierender Immunkomplexe steigt in MRL-*lpr/lpr* Mäusen ab einem Alter von ca. 3 Monaten stark an. Wegen des raschen Voranschreitens der Erkrankung und der Vorhersagbarkeit der pathologischen Befunde, wird das MRL/lpr-Modell gern für die Untersuchung der Pathogenese der autoimmunen SLE-Erkrankung verwendet.

1.7 Identifizierung von Th1- und Th2-Zellen

Das Th1-/ Th2-Konzept stellt zwar eine Vereinfachung dar, hat sich aber auch als sehr hilfreich für die Beschreibung und das Verständnis von Immunantworten bei Infektionen und Autoimmunerkrankungen erwiesen. Th1- und Th2-Zellen haben eine zentrale Bedeutung für den Verlauf einer Immunantwort. Für eine genauere Charakterisierung dieser Zellen bei

Immunantworten *ex vivo* ist ihre Identifizierung auf Einzelzellebene in intaktem und lebendem Zustand von besonderem Interesse. Zum jetzigen Zeitpunkt werden Th1- und Th2-Zellen vorrangig aufgrund ihres Expressionsmusters an Zytokinen und Transkriptionsfaktoren identifiziert. Zytokine werden jedoch transient sezerniert und sind in den meisten Fällen nur nach einer *in vitro* Stimulierung in fixierten und permeabilisierten Zellen detektierbar. Die Expression von Transkriptionsfaktoren kann bislang nur auf mRNA-Ebene in lysierten Zellen untersucht werden.

Mithilfe stabil differenziell exprimierter Oberflächenmoleküle wäre die Identifikation von einzelnen, intakten und lebenden Th1- und Th2-Zellen für eine funktionelle Untersuchung der verschiedenen Th-Subpopulationen *ex vivo* möglich. Hinzukommend könnten mithilfe solcher Moleküle eventuell Immunantworten *in vivo* moduliert und möglicherweise Krankheiten therapiert werden.

Auf der Suche nach solchen Molekülen, wählte unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Firma Millennium Pharmaceuticals eine sogenannte „Differential Display“-Strategie. In Abb. 1.4 ist der schematische Ablauf dieser Analyse dargestellt.

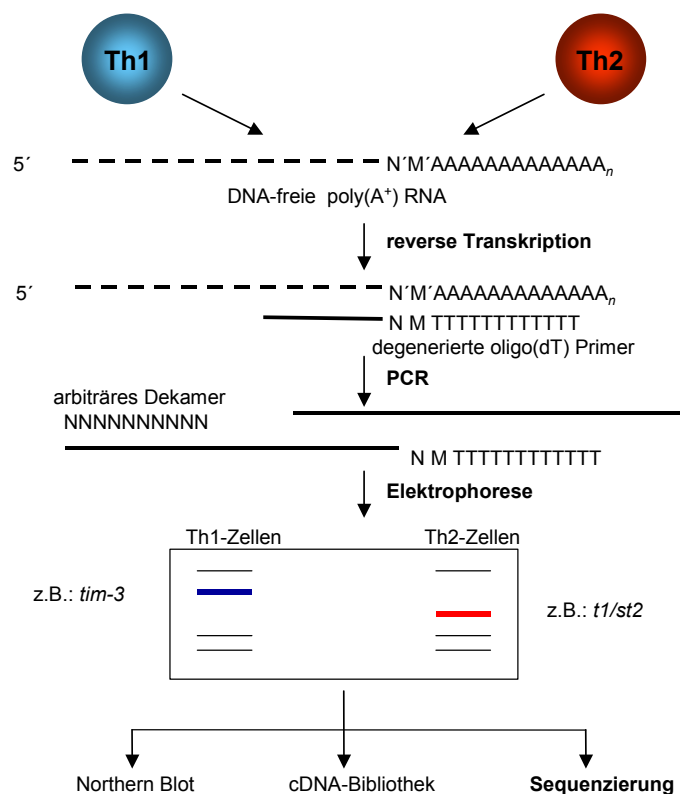


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der „Differential Display“-Analyse. Aus zwei Wochen alten murinen DO11.10 Th1- und Th2-Linien wurde jeweils die mRNA aufgereinigt, mit DNase behandelt und über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde eine Woche nach der zweiten Stimulierung gewonnen. Über eine PCR wurde die cDNA amplifiziert und die Produkte über Gelelektrophorese aufgetrennt. Differenziell exprimierte Gene wurden extrahiert, reamplifiziert, in Vektoren kloniert und sequenziert.

Um Gene zu identifizieren, die spezifisch Th1- oder Th2-Funktionen regulieren könnten, wurde eine subtraktive Bibliothek aus murinen Th1- und Th2-Linien hergestellt (Coyle et al., 1999; Löhning et al., 1998). Eines der Gene, welches als differenziell stärker von Th2-Zellen exprimiert gefunden wurde, war T1/ST2. Für T1/ST2 konnte inzwischen gezeigt werden, dass es von aktivierten Th2-Zellen sowie von Mastzellen und nicht von Th1-Zellen exprimiert wird (Kropf et al., 1999; Löhning et al., 1999; Löhning et al., 1998; Moritz et al., 1998; Xu et al., 1998a). T1/ST2 ist von Bedeutung für Effektorfunktionen von Th2-Zellen (Meisel et al., 2001). Durch Behandlung mit Antikörpern gegen T1/ST2 konnte eine Abnahme der Th2-Effektorfunktionen *in vivo* beobachtet werden (Coyle et al., 1999; Löhning et al., 1998).

Im Zuge der oben beschriebenen „Differential Display“-Untersuchung wurden auch im Vergleich zu Th2-Zellen stärker von Th1-Zellen exprimierte Gene ermittelt. Zu diesen Genen gehört das bis dahin unbekannte Oberflächenmolekül TIM-3.

1.8 TIM-3

TIM-3 ist eines von drei Mitgliedern der *tim* (T-Zell Immunglobulin- und Mucin-Domäne enthaltend)-Genfamilie. Die *tim*-Familie wurde erstmalig im Dezember 2001 von McIntire et al erwähnt, die zeigen konnten, dass Polymorphismen der *tim*-Genfamilie mit murinem Asthma assoziiert sind (McIntire et al., 2001).

TIM-3 ist ein Typ 1 Membranprotein und besteht aus 281 Aminosäuren (AS). Es enthält eine Ig-Domäne sowie eine Mucin-Domäne, welche aus 59 AS besteht. Mucine sind gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an Serin-, Threonin- und Prolin-Resten sowie O-verknüpfte Glykosylierung der Serin- und Threonin-Reste (Van Klinken et al., 1995).

Mucine werden in zwei Klassen eingeteilt, endotheliale und leukozytäre/ endotheliale Mucine, basierend auf dem Zelltyp, von dem sie exprimiert werden. TIM-3 wird zu den leukozytären/ endothelialen Mucinen gezählt. Der intrazelluläre Teil des TIM-3 Moleküls enthält 6 Tyrosinreste, wovon einer sich in einem möglichen Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv, RSEENIY, befindet. Der extrazelluläre Teil enthält fünf mögliche Stellen für O-verknüpfte Glykosylierung und vier für N-verknüpfte Glykosylierung.

Ein humanes Homolog mit 63% Homologie zum murinen Gen konnte identifiziert werden (Monney et al., 2002). Das Homolog in Ratten wurde als KIM-1 (engl.: kidney injury molecule-1) identifiziert (Ichimura et al., 1998). Die AS-Sequenz des murinen TIM-3 inklusive Kennzeichnung der erwähnten Regionen ist in Abb. 1.5 gezeigt.

Ein monoklonaler Antikörper, welcher spezifisch murines TIM-3 erkennt, wurde von den Kooperationspartnern bei der Firma Millennium Pharmaceuticals in Ratten hergestellt und stand für die durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung. Von den Kooperationspartnern wurden ebenfalls durch gezielte Mutagenese TIM-3 defiziente Mäuse hergestellt. Diesen Tieren fehlt das erste und zweite Exon des *tim-3* Gens, weshalb sie nicht in der Lage sind,

funktionales TIM-3 zu exprimieren. Sie wurden ebenfalls zur Verfügung gestellt und wurden für die durchgeführten Untersuchungen auf den BALB/c Hintergrund gekreuzt.



Abb. 1.5: Aminosäuresequenz des murinen TIM-3 Moleküls. Die Aminosäuren sind im Standard-IUPAC-Einbuchstabencode aufgeführt. Die Bereiche für das Signalpeptid, die Ig-Domäne, die Mucin-Domäne, die zytoplasmatische Region und den Transmembranbereich sind durch Pfeile gekennzeichnet. Ein mögliches intrazelluläres Tyrosin Phosphorylierungsmotiv ist rot hervorgehoben (nach (Monney et al., 2002)).

Da es über TIM-3 zu Beginn der Untersuchungen keine weiteren Informationen gab, wurde zunächst die Expression von TIM-3 auf Zellen des Immunsystems charakterisiert. Ferner wurde die Expression von TIM-3 bei Immunantworten gegen unterschiedliche Pathogene untersucht. Außerdem wurde die Expression von TIM-3 bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen analysiert. Es wurde geklärt, ob die TIM-3 Expression mit einem Th1-Phänotyp assoziiert werden kann. Ferner wurden mögliche immunologische Funktionen der TIM-3 Expression auf Th-Zellen untersucht.

2 Material

2.1 Mäuse

Mäuse werden unter SPF (engl.: specific pathogens free)-Bedingungen in den Räumen der DRFZ-Versuchstierzucht Marienfelde auf dem Gelände des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) gezüchtet, gehalten und von dort bezogen.

Folgende Inzuchtstämme, transgene Stämme und knockout-Stämme wurden eingesetzt:

- BALB/c: Diese Mäuse besitzen einen H-2^d Haplotyp.
- C57BL/6: Diese Mäuse besitzen einen H-2^b Haplotyp.
- AKR: Diese Mäuse besitzen einen H-2^k Haplotyp.
- DBA/1: Diese Mäuse besitzen einen H-2^q Haplotyp.
- DBA/2: Diese Mäuse besitzen einen H-2^d Haplotyp.
- MRL/lpr: Diese Mäuse haben einen gemischten Hintergrund und eine natürlich entstandene Mutation. Die *lpr* (engl.: lymphoproliferation) Mutation liegt an der Insertion von ETn (engl.: early transposable element) in das zweite Intron des *Fas* Gens (Adachi et al., 1993). Das bewirkt eine starke Reduktion der *Fas* mRNA Expression und wird klinisch mit einer stark beschleunigten SLE ähnlichen Erkrankung in Verbindung gebracht (Drappa et al., 1993).
- DO11.10: Diese Mäuse sind transgen für den α/β -T-Zell-Rezeptor (TZR) der T-Zell-Hybridomlinie DO11.10, welcher für ein Peptid (323-339) des Ovalbumin-Proteins spezifisch ist (Murphy et al., 1990). Das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ wird gebunden am MHC-Klasse-II-Molekül-I-A^d erkannt. Die Mäuse werden auf dem BALB/c-Hintergrund (H-2^d Haplotyp) gehalten.
- TIM-3^{-/-}: Diese Mäuse sind defizient für die Expression von TIM-3, da ihnen das erste und zweite Exon des *tim-3* Gens fehlt. Sie wurden von der Firma Millennium Pharmaceuticals durch gezielte Mutagenese hergestellt und der AG Kamradt im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Sie wurden von uns auf den BALB/c Hintergrund (H-2^d Haplotyp) gekreuzt. Für Versuche wurden Tiere ab der 6. Rückkreuzung eingesetzt.
- IFN- γ ^{-/-}: Diese Mäuse sind defizient für IFN- γ Expression. Sie sind auf dem BALB/c Hintergrund und wurden vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (MPI-IB) bezogen.

2.2 Infektionsmodelle

BALB/c Mäuse wurden von Dr. M. Kursar, MPI-IB, mit *Listeria monocytogenes*, Stamm EGD Serovar 1/2a intravenös (*i.v.*) und/ oder oral (*p.o.*) infiziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

BALB/c Mäuse wurden von Dr. K. Bonhagen, DRFZ, subkutan (*s.c.*) mit *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

C57BL/6 Mäuse wurden von Prof. O. Liesenfeld, UKBF, mit *Toxoplasma gondii* peroral (*p.o.*) infiziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.3 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

• Agarose	Gibco
• Alum [®] (Aluminium-Magnesiumhydroxid):	Pierce
• Ammoniumchlorid:	Merck
• BSA:	ICN
• Brefeldin A:	Sigma
• Dinatriumcarbonat:	Merck
• Dimethylsulfoxid:	Sigma
• dNTP:	Peqlab
• DNase I:	Boehringer
• Ethanol absolut.:	Merck
• Ether:	Roth
• Ethidiumbromid:	Merck
• Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA):	Sigma
• ExtrAvidin-Peroxidase:	Sigma
• FCS:	Sigma
• Ficoll Paque:	Pharmacia Biotech
• Glutamax:	Gibco
• Ionomycin:	Sigma
• Kaliumchlorid:	Merck
• Kollagenase D:	Roche
• Kollagenase Typ VIII:	Sigma
• Magnesiumchlorid:	Merck
• 2-methyl-2-butanol:	Fluka
• 2-Mercaptoethanol:	Gibco
• Microscint:	Packard
• Multistix [®] 10 SG (Teststreifen zur Harnanalyse)	Bayer

• Natriumacetat:	Sigma
• Natriumazid:	Sigma
• Natriumchlorid:	Sigma
• Natriumhydrogencarbonat:	Sigma
• Nycomed [®] :	Nycomed Pharma
• Orange G:	Sigma
• Paraformaldehyd:	Sigma
• Percoll:	Biochrom
• Phosphate buffered saline (PBS):	Sigma, Biochrom
• Penicillin-Streptomycin:	Gibco
• PMA:	Sigma
• Propidiumiodid (PI):	Sigma
• Proteinase K:	Sigma
• Rotiphenol [®] :	Roth
• Rotisol [®] :	Roth
• RPMI 1640:	Seromed, PAA, Gibco
• Saponin:	Sigma
• Schwefelsäure:	Merck-Schuchardt
• SDS:	Merck-Schuchardt
• Taq-Polymerase:	DRFZ/ Biotherm
• Tris:	ICN
• TrypanBlue Solution (0,4%):	Sigma
• 2,2,2-Tribromethanol:	Fluka
• TMB-Tabletten:	Sigma
• Tris-HCl:	Sigma
• Tween-20:	Merck-Schuchardt
• Wasser (nukleasefrei):	Biozym
• Wasserstoffperoxid:	Sigma
• Zitronensäure:	Sigma

2.4 Puffer und Medien

2.4.1 Sterile Puffer und Medien für die Zellkultur

• PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH=7,5
• PBS/BSA:	PBS/0,5% (w/v) BSA

- **Lysis-Puffer:** 10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl,
0,1mM EDTA; pH=7,5
- **MACS-Puffer:** PBS/0,5%(w/v) BSA/2mM EDTA
- **Kulturmedium (KM):** RPMI-1640
10% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert)
2 mM Glutamax
50 µM 2-Mercaptoethanol
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
- **Wasch-Medium (WM):** RPMI-1640; 1% (v/v)FCS (hitzeinaktiviert)
- **Nycodenz-Lösung:** 85 g Nycodenz, 130 ml RPMI 1640, 50 ml FCS
(hitzeinaktiviert), ad 500 ml mit H₂O_{dest};
290-299 mosmol/kg

2.4.2 Puffer für die Durchflusszytometrie

- **FACS-Puffer (PBA):** PBS/0,5%(w/v) BSA/0.01%(w/v) NaN₃
- **Saponin-Puffer:** PBS/ 0,5%(w/v) Saponin/ 0,5%(w/v) BSA/0.01%(w/v) NaN₃
- **Zell-Fixierungspuffer:** PBS/ 2%(w/v) PFA

2.4.3 Puffer für ELISA

- **PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl,
4,3 mM Na₂HPO₄•2H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄
- **Block-Puffer (ELISA):** PBS/ 0,5%(w/v) BSA
- **ELISA-Inkubations-Puffer (PBT):** PBS/0,5%(w/v) BSA/0,05%(w/v) Tween-20
- **ELISA-Wasch-Puffer:** PBS/ 0,05%(w/v) Tween-20
- **TMB-Puffer:** 51,4 mM Na₂HPO₄•2H₂O,
24,3 mM Zitronensäure; pH= 5,0
- **ELISA-Stop-Lösung:** 12,5% H₂SO₄

2.4.4 Puffer für die Molekularbiologie

- **Verdauungspuffer:** 0,5 mg/ml Proteinase K; 0,1 M NaCl; 0,1% (w/v)
SDS, 50 mM Tris•HCl, pH 8,0; 10mM EDTA

- **5x Probenpuffer:** 50 %(v/v) Glycerin, 10mM Tris;
10 mg/ml Orange G
- **Laufpuffer (50x TAE):** 242 g/l Trisbase, 57,1 ml/l Essigsäure(96%), 10%
EDTA (0,5M); pH =8,6

2.5 Antikörper und rekombinante Zytokine für die Zellkultur

Die aufgeführten Antikörper wurden entweder von BD-Pharmingen erworben oder mittels Protein-G-Sepharose von Mitarbeitern des DRFZ oder des MPI-IB aus den Überständen von Rattenhybridom B-Zelllinien, die jeweils eine eigene Klonnummer besitzen, gewonnen und sterilfiltriert. Ein monoklonaler anti-TIM-3 Antikörper wurde im Rahmen einer Kooperation von Millennium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt. Folgende sterilfiltrierte, monoklonale Antikörper mit Spezifität für murine Antigene wurden in der Zellkultur eingesetzt:

<u>Spezifität:</u>	<u>Klon:</u>	<u>Isotyp:</u>	<u>Quelle:</u>
IL-4	11B11	R. IgG2b, κ	DRFZ
IFN- γ	AN18.17.24	R. IgG	DRFZ
IL-12	C17.8	R. IgG2a	DRFZ
CD3	145-2C11	Ar.H. IgG1, κ	DRFZ
CD28	37.51	Ar.H. IgG1, I	MPI-IB
TIM-3	8H7	R. IgG1	Millennium
Isotypkontrolle	R3-34	R. IgG1	BD Pharmingen

Folgende rekombinanten (rek.) Proteine und Stimulantien wurden in der Zellkultur eingesetzt:

- rek.IL-12: Genetic Institute
- rek.IL-4: R&D Systems
- rek.huIL-2: Proleukin
- TIM-3 Ig-Fusionsprotein wurde freundlicherweise von Dr. A. Coyle, Millennium Pharmaceuticals, zur Verfügung gestellt.
- *Toxoplasma gondii* Lysat Antigen (TLA) wurde von Mitarbeitern von Prof O. Liesenfeld, Med. Mikrobiologie, FU-Berlin, hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden zum Teil von kommerziellen Anbietern gekauft oder von Mitarbeitern des DRFZ aus den Überständen von Rattenhybridom B-Zelllinien, die jeweils eine eigene Klonnummer besitzen, gewonnen. Bei biotinylierten, digoxigenierten und mit Fluorochromen konjugierten Antikörpern variiert die in den Versuchen eingesetzte Konzentration von Charge zu Charge, da die Konjugationen unterschiedlich effizient sind. Die eingesetzten Konzentrationen wurden durch Bestimmung

der optimalen Ratio zwischen spezifischer und unspezifischer Zelfärbung für jede Charge experimentell neu bestimmt.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die folgenden Antikörper ungekoppelt eingesetzt:

- anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2/75) in einer Konzentration von 20-30 µg/ml, bezogen vom DRFZ
- aufgereinigtes, polyklonales Ratten-IgG in einer Konzentration von 100 µg/ml, bezogen von Dianova
- anti-TIM-3 (Klon 8H7) in einer Konzentration von 30-60 µg/ml, zur Verfügung gestellt von Millennium Pharmaceuticals
- anti-T1/ST2 (Klon 3E10) in einer Konzentration von 30-60 µg/ml, zur Verfügung gestellt von Millennium Pharmaceuticals

Die folgenden anti-murinen monoklonalen Antikörper (mAk) wurden als Konjugate mit Biotin (Bio), Digoxigenin (Dig) oder den Farbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Indodicarbocyanin (Cy5) in Konzentrationsbereichen von 1-10µg/ml verwendet:

2.6.1 Antikörper gegen murine Oberflächenmoleküle

<u>Spezifität:</u>	<u>Klon:</u>	<u>Isotyp:</u>	<u>Konjugat:</u>	<u>Quelle:</u>
CD3 _ε	145-2C11	Ar.H. IgG1, κ	-FITC, -PE, -Cy5	DRFZ/ Pharmingen
CD4	GK1.5	R. IgG2b, κ	-FITC, -PE, -Cy5; -Bio; -Dig	DRFZ
CD8a (Ly-2)	53-6.7	R. IgG2a, κ	-PE; Cy5	DRFZ
γ/δ TZR	UC7-13D5	Ar.H. IgG3, κ	-Cy5	MPI-IB
OVA-TZR	KJ1-26.1	R. IgG	-FITC, -PE, -Cy5	DRFZ
Vβ8.1,8.2 TZR	MR-5.2	M. IgG2a, κ	-PE	Pharmingen
CD11c	N418		-PE; -Cy5	DRFZ
CD11b (Mac-1)	M1/70.15.11	Ar.H. IgG1, I	-FITC, -PE	DRFZ
CD19	1D3	R. IgG2a, κ	-Cy5	Pharmingen
CD45R (B220)	RA3.6B2	R. IgG2a, κ	-FITC, -PE, -Cy5	DRFZ
MHCII (I-A ^b / I-A ^d / I-E ^d ,k)	M5-114.15.2	R. IgG2b, κ	-FITC, -PE	DRFZ
CD25 (IL-2Rα, p55)	PC61	R. IgG1, I	-APC	Pharmingen
CD44 (Pgp-1, Ly-24)	IM-7	R. IgG2b, κ	-Bio	Pharmingen

<u>Spezifität:</u>	<u>Klon:</u>	<u>Isotyp:</u>	<u>Konjugat:</u>	<u>Quelle:</u>
CD62L (L-Selektin, LECAM-1, Ly-22)	Mel-14	R. IgG2a, κ	-Bio, -PE, -Cy5	DRFZ
CD69 (VEA)	H1.2F3	Ar.H. IgG1, I	-Bio	Pharmingen
CD134 (OX-40 Ag)	OX-86	R. IgG1, κ	-Bio	Pharmingen
CD154 (CD40L, gp 39)	MR1	Ar.H. IgG3, κ	-APC	Pharmingen
ICOS	IC-280	R. IgG1	-Bio	RKI
T1/ST2	3E10	R. IgG1	-Bio	Millennium/ DRFZ
TIM-3	8H7	R. IgG1	-FITC, -Bio; -Cy5	Millennium/ DRFZ
Isotypkontrolle	R3-34	R. IgG1	-FITC	Pharmingen

2.6.2 Antikörper gegen murine intrazelluläre Zytokine

<u>Spezifität:</u>	<u>Klon:</u>	<u>Isotyp:</u>	<u>Konjugat:</u>	<u>Quelle:</u>
IFN- γ	AN18.17.24	R. IgG	-FITC, -Dig	DRFZ
IL-4	11B11	R. IgG2b, κ	- PE, -APC	Pharmingen
TNF- α	MP6-XT22	R. IgG1	-FITC	Pharmingen
IL-2	JES6-5H4	R. IgG2b, κ	-APC	Pharmingen
IL-2	S4B6	R. IgG2a	-FITC, -Dig	DRFZ
IL-10	JES5-16E3	R. IgG2b, κ	-PE, -APC	Pharmingen
IL-5	TRFK5	R. IgG1	-PE, APC	Pharmingen
IL-17	TC11-18H10	R. IgG1	-Dig	Pharmingen/ DRFZ
Isotypkontrolle	R3-34	R. IgG1	-FITC, -PE, -APC	Pharmingen
Isotypkontrolle	R35-95	R. IgG2a	-FITC, -PE	Pharmingen
Isotypkontrolle	A95-1	R. IgG2b	-FITC, -PE, -APC	Pharmingen

2.6.3 Sekundärfarbstoffe

Biotinylierte und digoxygenierte Primärantikörper wurden mit Fluorochrom konjugierten Sekundärfarbstoffen für die durchflusszytometrische Detektion markiert. Für biotinylierte Primärantikörper wurde Fluorochrom konjugiertes Streptavidin (SA) und für digoxygenierte Primärantikörper wurde ein Fluorochrom konjugiertes, polyklonales anti-Dig Fab-Fragment verwendet. Die eingesetzten Sekundärfarbstoffe wurden entweder gekauft oder unkonjugiert erworben und von Mitarbeitern des DRFZ mit Fluorochromen konjugiert und austitriert. Folgende Sekundärfarbstoffe wurden als Konjugate mit den Farbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), Allophycocyanin (APC) und Indodicarbocyanin 5 (Cy5) verwendet:

<u>Sekundärfarbstoff:</u>	<u>Quelle:</u>	<u>Sekundärfarbstoff:</u>	<u>Quelle:</u>
SA-FITC	DRFZ/ Roche	SA-Cy5	DRFZ
SA-PE	BD Pharmingen	anti-Dig-FITC	DRFZ
SA-PerCP	BD Pharmingen	anti-Dig-PE	DRFZ
SA-APC	BD Pharmingen	anti-Dig-Cy5	DRFZ

2.7 Proteine und Antikörper für ELISA und Immunisierungen

- anti-MausIgG-PO: Sigma
- Esel-anti-Ziege IgG-HRP: Santa Cruz Biotech
- mouse isotyping Kit mit Antikörpern
aus Ziege gegen murines IgG1,
IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA: Sigma
- Ovalbumin (OVA): Sigma
- *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB): Sigma
- rekombinantes humanes GPI wurde von David Schubert, DRFZ, im PQE100S Vektor mit 6 N-terminalen Histidinresten hergestellt, nach IPTG Induktion im *E.coli* Stamm BL21 exprimiert und über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt, sterilfiltriert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.8 MACS-Beads und Säulen für Zellsortierungen

Sämtliche, für Sortierungen muriner Zellen verwendeten Produkte wurden von der Firma Miltenyi bezogen und laut Herstellerangaben verwendet.

MACS-Beads :CD4, CD62L, CD90, CD8, anti-FITC Multisort-Kit

Säulen mit passenden Magneten: MS⁺, LS⁺, LD, BS, CS

2.9 Synthetisches Peptid

Das verwendete Peptid wurde nach Standard-Protokollen für Fmoc-Maschinen mit einem Peptid-Synthesegerät (Abimed) hergestellt und über rpHPLC (engl.: reversed-phase high-performance liquid chromatography) und MALDI-TOF (engl.: matrix associated laser desorption ionisation-time of flight) Massenspektrometrie aufgereinigt und analysiert.

Bei OVA₃₂₃₋₃₃₉ handelt es sich um ein 17mer Peptid (323-339) des Ovalbumin-Proteins aus Hühnereiweiss. OVA₃₂₃₋₃₃₉ besitzt ein Molekulargewicht von 2062 Da und hat folgende Aminosäure-Sequenz (Standard IUPAC-Einbuchstaben-Code):

323339
I S Q A V H A A H A E I N E A G R

OVA₃₂₃₋₃₃₉ wurde freundlicherweise von Mitarbeitern von Dr. Achim Kramer und Dr. Jens Schneider-Mergener, Institut für Medizinische Immunologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität, Berlin synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

2.10 Primer

Folgende Primer wurden von Tib-Molbiol bezogen:

neo-F: 5'-gAT TgA ACA AgA Tgg ATT gC (20mer)

neo-R: 5'-CAg AAg AAC TCg TCA AgA Ag (20mer)

200ko-F: 5'-gTT CTT CCC CAg gCT CTT TAC Agg (24mer)

200ko-R: 5'-CAg ggC AgA TAg gCA TTT TTA CCA (24mer)

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert, in nukleasefreiem Wasser gelöst (ad 50µM), aliquotiert und bei -20°C bis zum Verwenden gelagert.

2.11 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

- Brand: Pasteur-Pipetten
- Braun: Kanülen, Spritzen
- Corning/Costar: Petrischalen, Zellkulturflaschen, 96-, 48-, 24-, 12- und 6-Loch Zellkulturplatten, Reagent Reservoirs, 2-, 5-, 10- und 25ml-Einmal-Pipetten, 15ml- und 50ml- Polypropylen-Zentrifugenröhrchen, 125ml-Bottle-top-filter
- Eppendorf: Combitips, Reaktionsgefäße, 96-Loch PCR Platten
- Falcon/B.D.: Cell-Strainer (70µm, Nylon), 4ml FACS Röhrchen
- HSW: 1ml Spritzen
- Matrix: 1,4 ml Polypropylenröhrchen und Ständer, Verschlusskappenstrips
- Packard: Filterplatten (Unifilter GF/B), Abdeckklebeetiketten, Versiegelungsfolie
- Sarstedt: Reaktionsgefäße, 15ml- und 50ml- Polypropylen-Zentrifugenröhrchen
- Schleicher & Schuell: Einmal-Filterhalter (0.2µm)
- Roth: Combitips

2.12 Geräte

- Agarosegelelektrophoresekammer: B2 von Owl Separation Systems
- AutoMACS: Miltenyi
- Bestrahlungsanlage: Biobeam 2000 Cs¹³⁷ γ -Bestrahlungsanlage von STS
- Brutschrank: B6 und BB16Cu von Heraeus
- ELISA-Reader: Emax precision microplate reader von Molecular Devices
- Durchflusszytometer: FACScan von Becton Dickinson
- PCR-Maschinen: Gene Amp PCR System 2400 von Perkin-Elmer
Mastercycler® personal und Mastercycler® gradient von eppendorf
- Sterile Werkbank: Herasafe von Heraeus
- Trockenschrank: T6030 von Heraeus
- Ultraschallgerät: Sonoplus HD70 von Bandelin
- Zellerntegerät: Filtermate 196 Harvester von Packard
- Zentrifugen: Megafuge 1.0 (Rotor) von Heraeus
Megafuge 1.0R (Rotor) von Heraeus
Biofuge 13R (Rotoren 3743 und 3754) von Heraeus
Biofuge 22R (Rotor 3743) von Heraeus
Biofuge pico von Heraeus
Biofuge fresco von Heraeus

2.13 Grafische Darstellung und Statistik

Der studentische Zweistichproben-*t*-Test unter der Annahme gleicher Varianzen wurde zur Bestimmung eines statistisch signifikanten Unterschieds verwendet. Das Konfidenzniveau liegt bei $p = 0,05$. Werte wurden im Allgemeinen als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

Die Standardabweichungen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Dabei steht *S.D.* für Standardabweichung (engl.: standard deviation) und \bar{x} ist der Mittelwert aus n Einzelwerten von x .

Alle grafischen Darstellungen und statistischen Analysen wurden mit den Programmen Excel von Microsoft und Graphpad Prism durchgeführt.

3 Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 Markierung

Zur Identifikation der Mäuse in einem Käfig wurde mit einer chirurgischen Schere nach einem bestimmten Nummerierungsmuster ein Teil des Ohrfläppchens entfernt. Dies führte zu keinen Nebenwirkungen und war bei jeder Maus (bis auf Nr.1, deren Ohren intakt blieben) nur einmal erforderlich.

3.1.2 Genotypisierung der TIM-3^{-/-} Mäuse

3.1.2.1 Entnahme von Schwanzproben

Mäuse, die sich in einem Käfig befanden, wurden markiert (s. 3.1.1), und ihnen wurde jeweils ca. 1 cm des Schwanzendes abgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

3.1.2.2 Isolierung von genomischer DNA

Es wurden je 300 µl Proteinase K haltigen Verdauungspuffers zu den Schwanzproben gegeben und mind. 5h, meist über Nacht, bei 55°C verdaut. Zu den verdauten Proben wurde jeweils 1 Volumen Rotiphenol gegeben, durch vorsichtiges Schwenken vermischt und 5 Min. bei 16000 x g zentrifugiert. 150 µl der oberen, wässrigen, DNAhaltigen Phase wurden abgenommen. Die DNA wurde entweder durch Zugabe von 2 Volumina kaltem Ethanol absolut. und 2/10 Volumina 3M Natriumacetat 1h bei -20°C oder durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällte DNA wurde durch 20 minütige Zentrifugation bei 16000 x g sedimentiert, der Überstand verworfen und die DNA mit 200µl 70% (w/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Min. bei 16000 x g wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und in 150µl nukleasefreiem H₂O resuspendiert. Die so gewonnene genomische DNA wurde in der folgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

3.1.2.3 PCR

Für die Genotypisierung der TIM-3^{-/-} Mäuse wurden zwei verschiedene PCR-Ansätze benötigt, um homozygot defiziente von heterozygot defizienten und wildtyp Tieren unterscheiden zu können:

1. **neo PCR:** 850bp Fragment
- | | | |
|----------------|--------|---------------------------------------|
| <u>Primer:</u> | neo-F: | 5'-gAT TgA ACA AgA Tgg ATT gC (20mer) |
| | neo-R: | 5'-CAg AAg AAC TCg TCA AgA Ag (20mer) |

25µl Ansatz: 2,5µl 10xPuffer
 1,25µl 10xMgCl₂ (25mM)
 2,5µl dNTPs (2mM)
 2µl neo-F (50µM)
 1,7µl neo-R (50µM)
 13,6 µl dH₂O
 0,5µl Taq Pol.
 1µl DNA (z.B. aus Schwanzverdauung/ Phenolextraktion)

Lauf: 95°C, 3'
 95°C, 1' }
 55°C, 1' } x40
 72°C, 1'30" }
 72°C, 7'
 4°C, ∞

2. **tim-3 PCR:** 425bp Fragment

Primer: 200ko-F: 5'-gTT CTT CCC CAg gCT CTT TAC Agg (24mer)
 200ko-R: 5'-CAg ggC AgA TAg gCA TTT TTA CCA (24mer)

25µl Ansatz: 2,5µl 10xPuffer
 2,5µl 10xMgCl₂ (25mM)
 1,25µl dNTPs (2mM)
 0,12µl 200ko-F (50µM)
 0,08µl 200ko-R (50µM)
 17,05 µl dH₂O
 0,5µl Taq Pol.
 1µl DNA (z.B. aus Schwanzverdauung/ Phenolextraktion)

Lauf: 95°C, 5'
 95°C, 30" }
 55°C, 30" } x35
 72°C, 40" }
 72°C, 5'
 4°C, ∞

Für jeden PCR-Lauf wurden jeweils eine Wasser-Negativkontrolle, eine DNA-Negativkontrolle und eine DNA-Positivkontrolle mitgeführt.

Die Auswertung der PCR erfolgte durch Gelelektrophorese mit einem Agarosegel (1,5% in TAE) bei 130 V für 25-30 Min. Es wurde jeweils 3 µl Probenpuffer zum PCR-Produkt pipettiert, gemischt, und 15µl davon wurden in eine Tasche des Gels aufgetragen. Als Marker wurde Marker VI von Boehringer verwendet. Abb. 3.1 zeigt beispielhaft das Ergebnis solch einer Genotypisierung. Bei Mäusen mit einem wildtyp TIM-3 Genotyp (TIM-3^{+/+}) sieht man eine Bande in der *tim-3* PCR bei 425 bp, aber keine Bande in der *neo* -PCR bei 850 bp. Heterozygot TIM-3 defiziente Tiere (TIM-3^{+/-}) sind in beiden PCR positiv, während homozygot TIM-3 defiziente Tiere (TIM-3^{-/-}) nur ein Signal in der *neo*-PCR aber keines in der *tim-3* -PCR aufweisen.

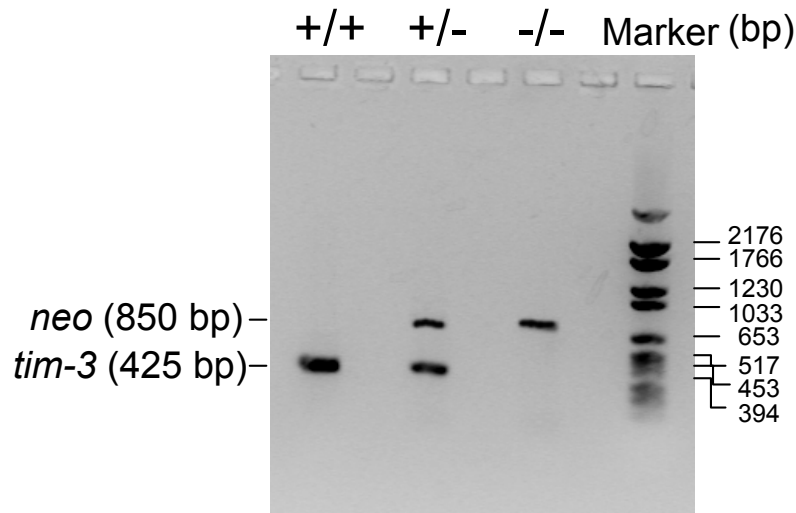


Abb.3.1: Beispiel einer Genotypisierung von TIM-3^{-/-} Mäusen mittels PCR. Jeweils 15µl des PCR-Produkts mit Probenpuffer wurden in die Taschen eines 1,5% Agarose/TAE Gels geladen und während 30-40 Min. bei 130V aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard-Marker wurde Marker VI von Boehringer verwendet. Homozygot TIM-3 wildtyp Tiere (TIM-3^{+/+}) sind *neo*⁻/*tim-3*⁺, heterozygot TIM-3 defiziente Tiere (TIM-3^{+/-}) sind *neo*⁺/*tim-3*⁺ und homozygot TIM-3 defiziente Tiere (TIM-3^{-/-}) sind *neo*⁺/*tim-3*⁻.

Die korrekte Genotypisierung von TIM-3^{-/-} Mäusen, die in Versuchen verwendet wurden, wurde zusätzlich durchflusszytometrisch mit Zellaliquots auf Proteinebene überprüft. Dies ist beispielhaft in Abb.3.2 dargestellt. Dendritische Zellen von TIM-3^{-/-} Mäusen können nicht mit anti-TIM-3 markiert werden (c) und gleichen der Negativkontrolle (d), während dendritische Zellen sowohl von normalen TIM-3^{+/+} (a) als auch von heterozygoten TIM-3^{+/-} (b) Mäusen TIM-3 stark auf der Oberfläche exprimieren.

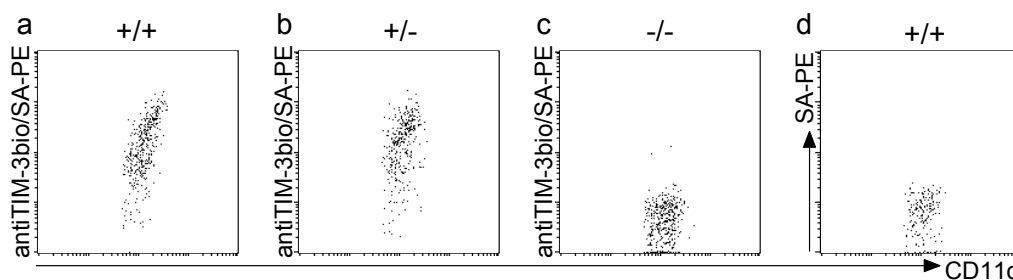


Abb.3.2: Überprüfung der Genotypisierung von TIM-3^{-/-} Mäusen auf Proteinebene. Zellaliquots von TIM-3^{+/+} (a und d), TIM-3^{+/-} (b) und TIM-3^{-/-} (c) Mäusen wurden mit Fluorochrom konjugierten anti-TIM-3, anti-CD11c und anti-CD11b markiert und am Durchflusszytometer untersucht. In den Dot Plots a-c ist die Expression von TIM-3 (y-Achse) gegen CD11c (x-Achse) von CD11c⁺/CD11b^{lo} dendritischen Zellen nach PI-Exklusion abgebildet. In Dot Plot d wurden die Zellen zur Kontrolle der TIM-3 Färbung nur mit Sekundärfarbstoff markiert.

3.1.2.4 Tierzucht

Für die Rückkreuzung der TIM-3 defizienten Mäuse auf den BALB/c Hintergrund wurden heterozygot defiziente Tiere mit BALB/c Mäusen verpaart und ihre Nachkommen mit der neo-PCR genotypisiert. *neo*⁺, also TIM-3^{+/-}, Tiere wurden wieder mit BALB/c Mäusen

verpaart. Nach der 6. Rückkreuzung wurden TIM-3^{+/-} Tiere untereinander verpaart, um TIM-3^{+/+} und TIM-3^{-/-} Tiere für Versuche zu erhalten.

3.1.3 Immunisierungen und Infektionen

Die Immunisierungen und Infektionen wurden in den Infektionsbereichen bzw. den Versuchsbereichen des DRFZ, des MPI-IB und des UKBF durchgeführt und waren durch die Tierversuchsvorhaben G0429/97, G0251/00, G0176/02 und G0216/01 beim Landesamt für Arbeitsschutz und technische Sicherheit des Landes Berlin angemeldet.

3.1.3.1 Immunisierung von Mäusen mit GPI zur Induktion einer Arthritis

Für die Immunisierung wurde eine Emulsion aus Adjuvans und der Proteinlösung mit rekombinant hergestelltem GPI-His hergestellt. Adjuvans kann die Immunogenität der Proteine verstärken. Für die Immunisierung wurden 250– 450µg Protein in 200µl PBS mit dem gleichen Volumen Adjuvans gemischt. Das Gemisch mit zwei Phasen wurde für einige Sekunden mit Ultraschall behandelt, bis eine feste, weiße Emulsion entstand. Danach wurden DBA/1 Mäuse mit Ether narkotisiert und je 100µl Emulsion in beide Seiten der Schwanzbasis subkutan (s.c.) injiziert. Im Anschluss daran wurden die Vorder- und Hinterläufe der Mäuse regelmäßig auf klinische Symptome einer Arthritis kontrolliert. Es traten nach etwa 8-10 Tagen erste Schwellungen auf. Diese wurden über einen klinischen Index für jeden Lauf zunächst einzeln gewertet:

- Krankheitsgrad 0: klinisch unauffällig
- Krankheitsgrad 0,5: leichte Rötung und leichte Schwellung
- Krankheitsgrad 1: starke Rötung und starke Schwellung

Die Krankheitsgrade der einzelnen Läufe einer Maus wurden jeweils addiert, so dass ein maximaler Krankheitsgrad von 4 pro Tier erreicht werden konnte.

In Abb. 3.3 werden beispielhaft Vorder- und Hinterpfoten von gesunden (Krankheitsstadium jeweils 0) und kranken Mäusen (Krankheitsstadium jeweils 1) gezeigt.

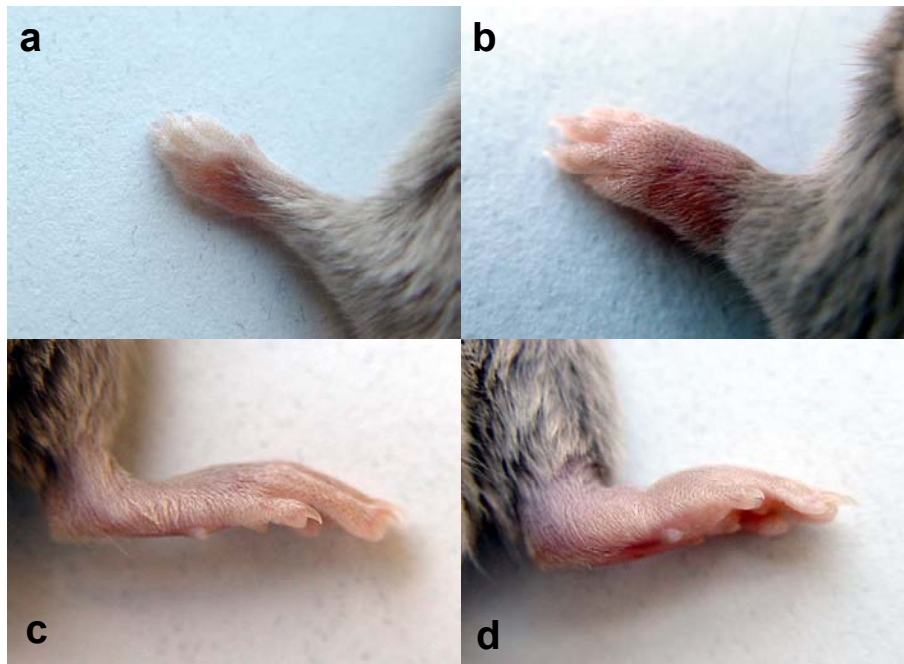


Abb. 3.3: Krankheitsstadien der GPI-induzierten Arthritis. Dargestellt sind Vorder- (a und b) und Hinterpfoten (c und d) von gesunden Mäusen mit dem Krankheitsgrad 0 (a und c) und von kranken Mäusen mit jeweils dem Krankheitsgrad 1 (b und d).

3.1.3.2 Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin

TIM-3^{-/-} und TIM-3^{+/+} Tieren passenden Alters und Geschlechts wurden 100 µg Ovalbumin (OVA) in 0,2 ml Alum[®]-Lösung intraperitoneal (*i.p.*) injiziert. Die Injektionslösung wurde frisch hergestellt, indem 1mg/ml OVA in PBS in das gleiche Volumen Alum unter ständigem Rühren hineingetropt und anschließend für 30 Min. verrührt wurde. Die Sekundärimmunisierung erfolgte 21 Tage nach der Primärimmunisierung. Hierfür wurden 50 µg OVA in PBS in einem Volumen von 50 µl mit einer 0,4 mm Kanüle intravenös (*i.v.*) in die laterale Schwanzvene injiziert.

3.1.3.3 Immunisierung von Mäusen mit SEB

TIM-3 defizienten und wildtyp BALB/c Mäusen wurden 50 µg SEB in PBS in einem Volumen von 100 µl mit einer 0,4 mm Kanüle *i.v.* in die laterale Schwanzvene injiziert.

3.1.3.4 Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Die Infektionen wurden von Prof. O. Liesenfeld und Mitarbeitern durchgeführt. C57BL/6 Mäuse wurden oral (*p.o.*) mittels Gavage unter Verwendung einer gebogenen Knopfsonde mit jeweils 10 Zysten des *T. gondii* Stamms ME49 infiziert.

3.1.3.5 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die Infektion wurde von Dr. M. Kursar durchgeführt. BALB/c Mäuse wurden entweder *i.v.* oder *p.o.* mit *L. monocytogenes*, Stamm EGD Serovar 1/2a infiziert. Die Bakterien wurden bei 37°C über Nacht in TSB (Tryptic Soy Broth) Medium vermehrt, einmal in PBS gewaschen, in PBS 10% Glyzerin eingefroren und bei -80°C gelagert. Aliquots wurden aufgetaut und die Bakterienkonzentration durch Ausplattieren von seriellen Verdünnungen auf TSB-Agar bestimmt. Für *i.v.* Infektionen wurden 200 µl der entsprechend in PBS verdünnten Bakteriensuspension in die laterale Schwanzvene injiziert. Für eine *p.o.* Infektion wurden Übernachtskulturen zweimal in PBS gewaschen. Die Absorption der Bakteriensuspension wurde gemessen und die Bakterienkonzentration berechnet. Nach entsprechender Verdünnung wurden 200 µl der Bakteriensuspension mittels Gavage unter Verwendung einer gebogenen Knopfsonde verabreicht. Bei allen Infektionsversuchen wurde die Bakterienkonzentration der applizierten Verdünnung durch Ausplattieren kontrolliert.

3.1.3.6 Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Die Infektion wurde von Dr. K. Bonhagen durchgeführt. BALB/c Mäuse wurden *s.c.* mit jeweils 750 larvae *N. brasiliensis* im L3 Stadium infiziert.

3.1.4 Bestimmung der Proteinurie

Um den Proteingehalt im Urin von Mäusen zu bestimmen, wurden ein bis zwei Tropfen Urin auf dem entsprechenden Testfeld eines Multistix® Teststreifens zur Harnanalyse aufgefangen und die Proteinkonzentration über visuelle semiquantitative Auswertung nach 60 Sekunden anhand der Verfärbung des Testfeldes durch Farbvergleich mit dem Flaschenetikett abgelesen.

3.1.5 Blut- und Serumgewinnung

Blutproben wurden der Schwanzvene entnommen, nachdem die Maus für kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt wurde, um eine stärkere Durchblutung zu erreichen. Anschließend wurde die Schwanzvene mit einem Skalpell vorsichtig angeritzt. Der Maus wurden zwischen 3-8 Tropfen Blut entnommen. Sie wurde solange beobachtet, bis die Blutung vollständig zum Stillstand kam. Bei der Serumgewinnung wurde das Blut in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen gesammelt, für 2h bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehengelassen und für 10 Min. bei 450 x g zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig

abgenommen und bei -20°C eingefroren. Sollten Lymphozyten für weitere Untersuchungen aus dem Blut isoliert werden, wurde das Blut in EDTA beschichteten Röhrchen oder in PBS/Heparin aufgefangen, um die Gerinnung zu verhindern und, wie in 3.2.2.1 beschrieben, weiteraufgereinigt.

3.1.6 Euthanasie und Entnahme der Organe

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Tiere, die zur Organentnahme getötet wurden, waren unter T0270/01 beim Landesamt für Arbeitsschutz und technische Sicherheit des Landes Berlin angemeldet. Das Fell wurde mit 70% Ethanol desinfiziert. Mit einer sterilen Schere wurde ein ca. 2,5cm langer longitudinaler Hautschnitt auf der Bauchseite durchgeführt. Dann erfolgte die Entnahme der inguinalen und axialen Lymphknoten mit sterilen Pinzetten. Anschließend wurde das Peritoneum längsseits geöffnet.

Sollten Lunge und Leber entnommen werden, musste zunächst mit steriler Kochsalzlösung gespült werden, um das Blut, das sich in den Gefäßen dieser Organe befand, zu entfernen. Ansonsten wäre die aus diesen Organen isolierte Lymphozytenpopulation mit peripheren Lymphozyten aus der Blutzirkulation kontaminiert. Hierfür wurde der Brustkorb geöffnet, das Herz dargestellt und ein Loch in den rechten Vorhof geschnitten. Mit einer Spritze und einer 20G Kanüle wurde systemisch über die linke Kammer mit ca. 20 ml PBS/Maus perfundiert. Bei erfolgreicher Perfusion blähte sich die Lunge auf und wurde strahlend weiß und auch die Leber wurde sehr hell. Sollte nur die Leber entnommen werden, wurde nur über die Vena hepatica gespült, bis das Organ blutleer war. Lunge und Leber wurden rasch durch Schneiden und Rupfen entnommen und jeweils in Kulturmedium (KM) enthaltende Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt. Zuvor wurde die Gallenblase aus der Leber geschnitten.

Dann wurden die Milz und die mesenterialen, periaortalen und poplitealen Lymphknoten durch Zupfen mit sterilen Pinzetten entnommen und jeweils in KM enthaltende Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt.

Der Dünndarm wurde entnommen, indem er am Ende des Duodenum und vor dem Blinddarm abgeschnitten und das mesenteriale Gekröse abgestreift wurde. Aus dem Dünndarm wurden die Peyerschen Plaques mit einer sterilen Schere entfernt. Dann wurde der Dünndarm longitudinal aufgeschnitten, ausgiebig in PBS gewaschen und in ein 25 ml KM und einen kleinen, 1,5 cm langen magnetischen „Rührfisch“ enthaltendes 100ml Fläschchen auf Eis überführt.

Zur Gewinnung von Knochenmark wurden Femur und Tibia freigelegt, mit einer Schere an beiden Seiten vom Gelenk geschnitten und in eine Petrischale auf Eis gelegt.

Aus den auf diese Weise entnommenen Organen wurden dann, wie in Punkt 3.2.2 geschildert, Lymphozyten isoliert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Allgemeine Vorraussetzungen

Bei der Zucht von Zellen in Zellkultur müssen verschiedene Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, hauptsächlich um eine Kontamination der Kulturen mit Pilzen, Bakterien, Viren, Mycoplasmen, etc. zu vermeiden, aber auch zum Schutz des Experimentators beim Umgang mit Zell-Linien, die diesen gesundheitlich gefährden könnten. Alle Arbeiten müssen unter sterilen Bedingungen ausgeführt werden; sämtliche Geräte, Medien und Puffer, die mit den Zellen in direkte Berührung kommen können, wurden bei 180°C hitzesterilisiert oder bei 120°C/1 atü autoklaviert oder sterilfiltriert. Spezielle Kulturgefäße aus für die Zellkultur beschichtetem Kunststoff sind in sterilem Zustand im Handel erhältlich. Die Handhabung der Zellen (Ausplattieren, Ernährung, Umsetzen, Ernten) erfolgt ausschließlich in sterilen Werkbänken, deren Keimfreiheit durch regelmäßige UV-Bestrahlung und Reinigung mit Desinfektionsmitteln (70% EtOH, Kohrsolin) gewährleistet ist.

3.2.2 Isolierung von Lymphozyten aus verschiedenen Geweben

3.2.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut

Die Blutproben wurden in 20-30 ml PBS gewaschen und die Erythrozyten anschließend durch osmotische Lyse in Lysispuffer entfernt. Erythrozyten sind anfälliger für hypotonen Schock als Leukozyten und andere kernhaltige Zellen, weil sie aufgrund fehlender Zellorganellen keinen aktiven Transport von Ionen oder Wasser gegen einen Gradienten bewerkstelligen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in 10-20 ml Lysispuffer wurden die Zellen zweimal in WM gewaschen, gezählt und in der gewünschten Endkonzentration in KM aufgenommen.

3.2.2.2 Isolierung von Splenozyten

Mit Hilfe eines 70µm-Nylonfilters wurden aus steril entnommenen Milzen Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden einmal in WM gewaschen und die Erythrozyten anschließend durch osmotische Lyse in Lysispuffer entfernt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT in 1-5 ml Lysispuffer pro Milz wurden die Zellen zweimal in WM gewaschen, gezählt und in der gewünschten Endkonzentration in KM aufgenommen. Nach dem ersten Waschschrift wurde Zelldebris mittels eines 70µm Cell-Strainers entfernt.

3.2.2.3 Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten

Aus verschiedenen Lymphknoten wurden mittels eines 70µm-Nylonfilters Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden zweimal in WM gewaschen, gezählt und in der gewünschten Konzentration in KM aufgenommen.

3.2.2.4 Isolierung von IEL und LPL aus Dünndarm

Aus dem Dünndarm wurden intraepitheliale Lymphozyten (DD-IEL) und Lamina Propria Lymphozyten (DD-LPL) unter Verwendung des von Bonhagen und Kollegen beschriebenen Verfahrens isoliert (Bonhagen et al., 1996). Der Dünndarm wurde für 30 Min. bei 37°C in 25 ml KM/ 100ml Fläschchen im Wasserbad unter Rühren inkubiert, um die intraepithelialen Lymphozyten aus dem Gewebe zu lösen. Das Medium wurde abgenommen, und die Darmabschnitte wurden noch zweimal durch kräftiges Schütteln in komplettem Medium gewaschen. Die Überstände der verschiedenen Waschschrte, die die aus dem Dünndarm herausgelösten IEL enthalten, wurden vereinigt und durch einen 70µm-Nylonfilter filtriert. Zur Isolierung der Zellen aus der Lamina Propria wurde der Dünndarm anschließend in 0,5 cm lange Abschnitte geschnitten und in KM durch die Zugabe von 10µg/ml DNase I, 0,25 mg/ml Kollagenase D und 0,25 mg/ml Kollagenase Typ VIII für 1 bis 1,5 h bei 37°C in einem Rührwasserbad verdaut. Das verdaute Gewebe wurde mit einem 0,2 mm Metallsieb abgetrennt und die herausgelösten Zellen über einen 70µm-Nylonfilter weitergereinigt. Die so gewonnenen IEL- und LPL-Fraktionen wurden durch Zentrifugieren pelletiert, in komplettem Medium mit 40% Percoll aufgenommen, und mit dieser Zellsuspension wurde eine 70%ige Percoll-Lösung überschichtet. Der Percoll-Gradient wurde dann 30 Min. bei 750 x g zentrifugiert. Zellen mit höherer Dichte wie Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen wandern durch den Gradienten in die untere Phase. Mononukleäre Zellen geringerer Dichte wie Lymphozyten und Monozyten sammeln sich an der Grenzschicht, der Interphase. Die Zellen in der Interphase wurden mit einer Pasteurpipette entnommen, zweimal in komplettem Medium gewaschen, gezählt und in der gewünschten Konzentration in KM aufgenommen.

3.2.2.5 Isolierung hepatischer Lymphozyten

Die entnommene Leber wurde mit einem Spritzenkolben in einem 0,2 mm Metallsieb mit WM zerrieben. Die Zellsuspension wurde 30 Sek. bei 50 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut in WM aufgenommen, die Suspension wurde kurz zentrifugiert, und der Überstand wurde wieder abgenommen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen der vereinigten Überstände durch einen 40%/ 70%-Percoll-Gradienten weiter aufgereinigt, gezählt und in der gewünschten Konzentration in KM aufgenommen.

3.2.2.6 Isolierung von Lymphozyten aus der Lunge

Die Lunge wurde mit einem Spritzenkolben in einem 0,2 mm Metallsieb mit WM zerrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einem 70µm-Nylonfilter und anschließend einem 40%/70%-Percoll-Gradienten weiter aufgereinigt, gezählt und in der gewünschten Konzentration in KM aufgenommen.

3.2.2.7 Isolierung von Lymphozyten aus dem Knochenmark

Die Zellen wurden mit einer 16G oder 17G Kanüle mit Medium oder PBS aus dem Knochen gespült und bei 400 x g 5 Min. abzentrifugiert, einmal gewaschen, gezählt und in der gewünschten Konzentration aufgenommen.

3.2.3 Zählen von Zellen

Für die Auszählung wurden die Zellen mit Trypanblau gemischt. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv ausschließen, abgestorbene Zellen erscheinen blau. Auf diese Weise werden nur lebende Zellen bei der Zählung berücksichtigt.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind, um dem Experimentator das Zählen zu erleichtern. Legt man auf diese Kammer ein Deckgläschen, so befindet sich zwischen Zählkammer und Deckglas ein definiertes Volumen. Zählt man die Zellen in einem der großen Quadrate, kann die Zellzahl pro ml nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times VF \times 10^4$$

wobei : n = Anzahl der Zellen in einem großen Quadrat
 und VF = Verdünnungsfaktor

3.2.4 Sortieren von Zellen mittels MACS

Spezifische Zellpopulationen können unter geringem Zeitaufwand mit Hilfe des MACS (engl.: magnetic cell sorting, MACS®) Verfahrens aus komplexen Zellgemischen für weitere Untersuchungen isoliert werden. Dabei werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50 nm Durchmesser) konjugierte Antikörper (MACS-Beads) verwendet. Mit diesen MACS-Beads werden die gewünschten Zellen spezifisch markiert und auf eine spezielle Trennsäule gegeben, die mit Stahlwolle oder Stahlkugeln gefüllt ist und sich zwischen den Magnetpolen eines Hochleistungsmagneten befindet. Zwischen den Fäden der Stahlwolle, die außerhalb des Magneten nicht magnetisch ist, entsteht ein Hochgradientenfeld, so dass die markierten Zellen in der Säule festgehalten werden, während unmarkierte Zellen durch die Säule gespült und als negative Fraktion aufgefangen werden können. Die markierten Zellen werden durch Elution der Säule außerhalb des Magnetfelds gewonnen.

Die Zellaufreinigung mit magnetischen Partikeln kann, je nach Durchflussgeschwindigkeit und verwendeter Säule, zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von speziellen Zellpopulationen verwendet werden. Die Wahl der Methode hängt von der Art der Untersuchung und von der zu isolierenden Zellpopulation ab.

Jeder Schritt der Zellaufreinigung wurde in kaltem, entgastem MACS-Puffer durchgeführt, um das Entstehen von Luftblasen in der Säule zu verhindern. Einzelzellsuspensionen

wurden, wie unter 3.2.2 beschrieben, vorbereitet. Um verklumpte Zellaggregate zu entfernen, wurden die Zellen gut suspendiert und anschließend durch einen 70 µm Nylonfilter gegeben. Die Zellen wurden in PBS/BSA gewaschen und in einer Zellkonzentration von etwa 1×10^7 Zellen pro 100 µl in MACS-Puffer aufgenommen.

Die MACS-Beads wurden der Zellsuspension in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung hinzugefügt und die Zellen 15-20 Min. bei 2-8°C (im Kühlschrank) inkubiert. Ungebundene MACS-Beads wurden durch Waschen mit dem 10-20fachen Markierungsvolumen MACS-Puffer beseitigt und das Zellgemisch in einer Zellkonzentration von bis zu 1×10^8 Zellen/500 µl MACS-Puffer über geeignete, äquilibrierte, in einem passenden Magneten hängende MACS-Säulen oder am AutoMACS mit dem geeigneten Programm sortiert. Die Kapazität der zur Trennung verwendeten Säule richtete sich nach der Gesamtzahl der zu separierenden Zellen. Vor und nach der Separierung wurden Zellaliquots entnommen und durchflusszytometrisch untersucht, um die Effektivität der Sortierung zu überprüfen. In Abb.3.4 ist beispielhaft die durchflusszytometrische Überprüfung einer positiven Selektion naiver Th-Zellen in zwei Schritten (Abb.3.4, A) und einer Depletion von T-Zellen (Abb.3.4, B) abgebildet. Zur Überprüfung der Reinheit wurden jeweils alle lebenden Zellen nach PI-Exklusion angezeigt.

Naive Th-Zellen wurden über eine magnetische Zweischritt-Zellsortierung gewonnen. In einem ersten Schritt wurden $CD4^+$ Zellen angereichert, von denen die $CD62L^+$ Zellen aufgereinigt wurden. Die Expression von CD62L ist auf naiven Th-Zellen sehr hoch und wird nach Aktivierung herabreguliert. Zunächst wurden Splenozyten primär mit anti-CD4-FITC markiert, gewaschen und anschließend mit anti-FITC-Beads markiert, gewaschen und über zwei aufeinanderfolgende MACS-Säulen oder am AutoMACS aufgetrennt. So wurde eine Population von mind. 96% $CD4^+$ Zellen erreicht (s. Abb.3.4). Der paramagnetische Teil der anti-FITC-Beads wurde mit dem im Kit enthaltenen Enzym laut Herstellerangaben abgespalten und über eine weitere MACS-Säule von den $CD4^+$ Zellen getrennt. Nun wurden die Zellen mit anti-CD62L-Beads markiert und über eine weitere Säule aufgetrennt. Die auf diese Weise erhaltenen $CD4^+ CD62L^+$ Zellen waren in allen Versuchen zu mindestens 96% $CD4^+$ und zu mindestens 71% $CD4^+ CD62L^+$.

T-Zell depletierte APZ wurden aus BALB/c Splenozyten durch Depletion mit CD90-, CD4- und CD8-MACSBeads und Verwenden von manuellen BS-, CS- oder LD-Säulen oder des Depletionsprogramms am AutoMACS gewonnen. Die Reinheit der T-Zell depletierten APZ war in allen durchgeführten Sortierungen höher als 99%.

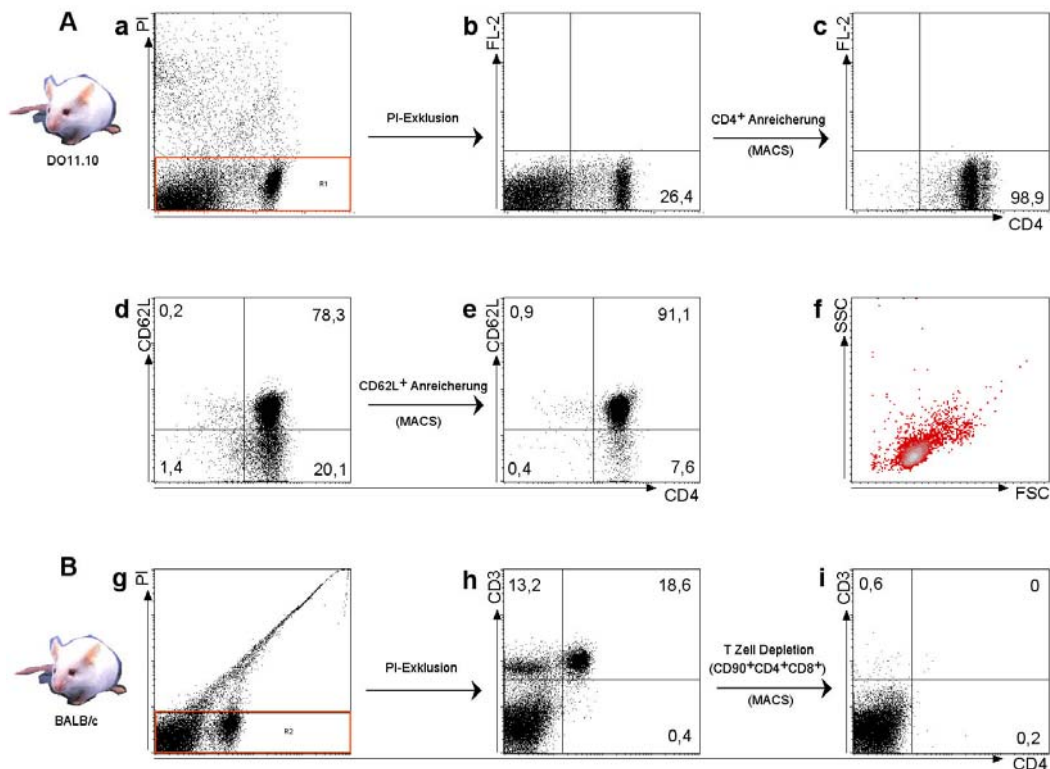


Abb.3.4: Abgebildet ist ein Beispiel für die durchflusszytometrische Überprüfung einer Anreicherung naiver Th-Zellen aus Milzen von DO11.10 Mäusen (A) und einer Herstellung T-Zell depletierter APZ aus Milzen von BALB/c Mäusen (B) mittels MACS. Nach PI-Exklusion (a/g: rote Auswahlfenster) werden nur lebende Zellen in den übrigen Dot Plots (b-f, h-i) angezeigt. In den Quadranten ist jeweils der Anteil in Prozent angegeben. Vor der CD4-Anreicherung sind ca. 26% der Splenozyten CD4⁺ (b), die mittels MACS auf über 98% angereichert werden können (c). Von diesen Zellen sind vor dem zweiten Anreicherungsschritt ca. 78% CD62L⁺ (d), danach sind es über 90% (e), die im FCS/SSC Plot die Morphologie naiver Lymphozyten zeigen (f). Die APZ werden aus BALB/c Splenozyten (h) durch Depletion mit CD90-, CD4- und CD8-Beads gewonnen. Die Reinheit der eingesetzten Zellen übersteigt 99% (i).

3.2.5 In vitro Kultur von Mauszellen

3.2.5.1 Allgemeine Vorraussetzungen

Das Wachstum und die Vermehrung von Zellen in Zellkultur hängen im Wesentlichen von zwei Faktoren ab: Umweltbedingungen und Nährstoffangebot.

Optimale äußere Bedingungen (37°C; 5% CO₂; 95% Luftfeuchtigkeit) werden in geeigneten Brutschränken konstant gehalten.

Zellkulturmedien basieren auf einem synthetischen Grundmedium (RPMI), welches aus Salzen, Zuckern, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen besteht. Diesem wird tierisches Serum (meist FCS) nicht genau bekannter Zusammensetzung zugesetzt, um die Mauszellen mit Hormonen und Wachstumsfaktoren zu versorgen, die eine wichtige Voraussetzung für die Proliferation der Zellen darstellen. Außerdem enthält das Medium die Antibiotika Penicillin und Streptomycin, um einer Kontamination durch Bakterien vorzubeugen. Es hat sich gezeigt, dass die Lymphozyten von Mäusen durch Zusatz

geringer Mengen β -Mercaptoethanol besser gedeihen. Bei sehr geringem Serumgehalt des Mediums (1%) vermehren sich die Zellen nur sehr zögernd bis gar nicht und können auf diese Weise einige Wochen in der G⁰-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Enthält die Nährlösung einen höheren Anteil an FCS, üblicherweise 10%, wachsen die Zellen, bis ihr Wachstum durch gegenseitige Berührung gebremst wird. Dann müssen die Zellen durch Umsetzen verdünnt und/oder mit frischen Nährstoffen versorgt werden. Unter dem Lichtmikroskop sehen gesunde Lymphozyten hell und rund aus. Alle Mauslymphozyten wurden in handelsüblichen Zellkultur-Platten oder –Flaschen kultiviert.

3.2.5.2 Herstellung und Kultur muriner T-Zelllinien

T-Zelllinien wurden entweder durch polyklonale Aktivierung von Th-Zellen mittels anti-CD3- und anti-CD28-Stimulation oder durch die Aktivierung OVA-TZR-transgener Th-Zellen aus DO11.10 Mäusen mit bestrahlten, T-Zell depletierten APZ aus syngen BALB/c Mäusen und dem spezifischen Antigen OVA₃₂₃₋₃₃₉ hergestellt.

Um polarisierte Th1-Linien zu erhalten, wurden die Zellen in Anwesenheit von rek. IL-12 (10 ng/ml) und anti-IL-4 (5 μ g/ml) in KM stimuliert, und um Th2-Linien zu erhalten, in Anwesenheit von rek. IL-4 (10 ng/ml) und anti-IL-12 (5 μ g/ml) in KM. Th0-Linien wurden ohne polarisierende Zusätze in KM stimuliert.

Für die polyklonale Aktivierung wurden Zellkulturplatten über Nacht mit anti-CD3 (3 μ g/ml) und anti-CD28 (2,5 μ g/ml) in PBS bei 2-8°C (im Kühlschrank) beschichtet und am Folgetag dreimal mit PBS und einmal mit Medium gewaschen und verwendet oder zweimal mit PBS gewaschen und leer bei –20°C bis zur Verwendung gelagert. Einige Vertiefungen wurden zusätzlich zu anti-CD3/anti-CD28 mit anti-TIM-3 (10 μ g/ml) oder TIM-3-Ig Fusionsprotein (20 μ g/ml) oder einem Kontrollantikörper des passenden Isotyps (10 μ g/ml) beschichtet.

Die naiv (CD4⁺ CD62L⁺) oder CD4⁺ sortierten T-Zellen aus Milz und/oder Lymphknoten von BALB/c Mäusen wurden in einer Konzentration von 2-3x10⁶ Zellen/ml in KM mit oder ohne polarisierende Zusätze auf die beschichtete Zellkulturplatte gegeben. Einigen Ansätzen wurde zusätzlich anti-TIM-3 (10 μ g/ml) oder TIM-3-Ig Fusionsprotein (20 μ g/ml) löslich zugefügt.

Für die spezifische Aktivierung wurden naive OVA-TZR-transgene Th-Zellen aus Milzen und Lymphknoten von DO11.10 Mäusen und T-Zell depletierte APZ aus Milzen von syngen BALB/c Mäusen, wie in 3.2.4 beschrieben, gewonnen. Die APZ wurden mit 30 Gy in einer Bestrahlungsanlage (γ -Strahler, Co) bestrahlt, um reinere T-Zell-Kulturen zu erhalten. Die Dosis der Bestrahlung ist so gewählt, dass die Zellen noch in der Lage sind, Antigen zu präsentieren und kostimulatorische Signale weiterzugeben, die Fähigkeit für Zellteilungen jedoch verloren haben und nach einigen Tagen absterben. Die APZ wurden im Anschluss noch ein- bis zweimal mit WM gewaschen, um während der Bestrahlung entstandene freie Radikale zu entfernen. Die T-Zellen wurden mit den APZ im Verhältnis 1 zu 3 gemischt und

in einer Gesamtkonzentration von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml in KM mit oder ohne polarisierende Zusätze auf eine geeignete Zellkulturplatte gegeben.

Drei Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die Kulturen mit 100U/ml rek. IL-2 gefüttert und je nach Zelldichte verdünnt und expandiert.

Sieben Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die Zellen geerntet und restimuliert. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 5-8 Min. bei $300-400 \times g$ sedimentiert und sorgfältig in KM resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde das gleiche Volumen Nycodenzlösung in einem Polypropylenröhrchen überschichtet. Über Dichtegradientenzentrifugation bei $750 \times g$ für 20 Min. wurden tote Zellen abgetrennt. Die lebenden Lymphozyten in der Interphase wurden mit einer Pasteurpipette entnommen, zweimal in WM gewaschen, gezählt und in der gewünschten Konzentration in KM aufgenommen. Nun wurden die Zellen auf die gleiche Weise wie bei der Primärstimulation restimuliert. So konnten T-Zelllinien bis zu sechs Wochen in Kultur gehalten werden.

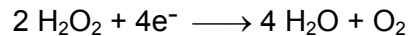
3.3 ELISA

Bei den verwendeten ELISA wurde eine polymere Matrix (96 Loch-Mikrotiterplatte aus Polyvinylchlorid) mit dem Antigen in PBS über Nacht bei 4°C (im Kühlschrank) beschichtet. Zur Bestimmung des Serumtiters OVA-spezifischer Antikörper (OVA-ELISA) wurden 100µl von 5µg/ml OVA in PBS und zur Bestimmung des Serumtiters GPI-spezifischer Antikörper (GPI-ELISA) wurden 100µl von 5µg/ml GPI in PBS pro Vertiefung eingesetzt. Dann wurden die Platten ausgeklopft. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe eines anderen Proteins (hier 0,5% (w/v) BSA in PBS, 100µl/Vertiefung) für 1h bei RT blockiert. Sodann wurden die Platten dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.

Nun wurden 100µl der zu testenden Seren jeweils in Triplikaten in einer Verdünnungsreihe aus 7 Schritten, beginnend mit einer 1:100 Verdünnung in PBT und dann in sieben 1:4 Schritten weiterverdünnt, auf die Platten gegeben. Als Negativkontrollen wurden Triplikate mit je 100µl PBT/Vertiefung mitgeführt. Beim GPI-ELISA wurde zusätzlich das Serum einer nichtimmunisierten Kontrolle mitgeführt. Die zu bestimmenden spezifischen Immunglobuline konnten dann an die Antigen-beschichteten Platten während 1h bei RT binden. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit anti-MausIg-Antikörpern.

Beim GPI-ELISA handelte es sich um ein Peroxidase gekoppeltes Fab-Fragment, welches spezifisch murine Antikörper der IgG-Klasse erkennt (verdünnt 1:5000 in PBT, 100µl/Vertiefung, 1h, RT). Beim OVA-ELISA wurde zunächst mit unkonjugierten Ziege-anti-Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM oder IgA Antikörpern (verdünnt 1:1000 in PBT, 100µl/Vertiefung, 1h, RT) inkubiert, dreimal gewaschen und anschließend mit Peroxidase gekoppeltem Esel-anti-Ziege Antikörper (verdünnt 1:3000 in PBT, 100µl/Vertiefung, 1h, RT) inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde das Substrat der Peroxidase (Wasserstoffperoxid, chem. H_2O_2) zugegeben. Hierfür wurde kurz vor Zugabe eine Lösung aus $n \times 10 \text{ ml}$ TMB-Puffer, n Tabletten TMB und $n \times 4 \mu\text{l}$ H_2O_2 frisch hergestellt und davon nach sechsmaligem Waschen je $100 \mu\text{l}$ pro Vertiefung rasch pipettiert. Die Peroxidase setzt ihr Substrat in Anwesenheit von einem Elektronendonator (wie TMB) in Wasser um; der Elektronendonator wird dabei oxidiert:



Das Oxidationsprodukt bildet eine farbige Substanz (in diesem Fall blau). Die Farbintensität ist proportional zur Peroxidase-Konzentration und folglich zur Anzahl der gebundenen Proteinmoleküle an Primär- und Sekundär-Antikörpern.

Sobald die Negativkontrolle (kein Serum) begann, sich blau zu färben, wurde die Oxidation des Substrats durch Zugabe einer Stopplösung (12,5% Schwefelsäure(w/v)) beendet, welche einen Farbumschlag von Blau nach Gelb verursachte. Die Extinktion wurde bei 450 nm in einem ELISA-Messgerät gemessen. Als Titer wurde die Verdünnung definiert, deren Extinktion größer bzw. gleich dem fünffachen Hintergrund war.

3.4 Durchflussszytometrie

3.4.1 Grundlagen

Die Durchflussszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung gefärbter Einzelzellen in Suspension anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Beim Durchflussszytometer findet eine gleichzeitige Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie bis zu vier verschiedener Fluoreszenzfarben statt. Zur Analyse wird die Zellsuspension in ein Probenröhrchen gegeben. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich eingeführt. Hier treten sie in eine haarfeine Messküvette ein, die von einem fokussierten Argon-Laser (488 nm, 200 mW) und einem HeNe (633nm) Laser durchstrahlt wird. Die Zellen können den Laser nur einzeln passieren. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden durch Spiegel- und Filtersysteme auf die verschiedenen Photoverstärkerröhren geleitet. Über einen angeschlossenen Computer werden die Messdaten verarbeitet und gespeichert. Von jeder Zelle werden die folgenden sechs Parameter analysiert :

- Vorwärtslichtstreuung (FSC=Forward Scatter; $2\text{-}10^\circ$ zum einfallenden Licht), welche proportional zur Zellgröße ist.
- Seitwärtslichtstreuung (SSC=Side Scatter; 90° zum einfallenden Licht), welche proportional zur Oberflächenstruktur (Membranfaltung) und Granularität der Zelle ist.

- Fluoreszenzintensität 1 (FL 1), welche proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist. FITC hat ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm.
- Fluoreszenzintensität 2 (FL 2), welche proportional zu der Intensität der Anfärbung einer Zelle mit R-Phycoerythrin (PE) ist. Dieses hat ein Absorptionsmaxima bei 488 und 565 nm und ein Emissionsmaximum bei 578 nm.
- Fluoreszenzintensität 3 (FL 3), welche proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit Propidiumiodid (PI) oder Peridinin Chlorophyll-a Protein (PerCP) ist. PI hat ein Absorptionsmaximum von 536 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm. PerCP wird bei 488 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum von 695 nm.
- Fluoreszenzintensität 4 (FL 4), welche proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit Indodicarbocyanin 5 (Cy5) oder Allophycocyanin (APC) ist. Cy5 hat ein Absorptionsmaximum zwischen 625 und 650 nm und ein Emissionsmaximum von 670 nm. APC wird bei 650 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum von 660 nm.

Bevor die Proben gemessen werden, muss ein Referenzwert vorgegeben werden, so dass relative Veränderungen der Fluoreszenzintensität bestimmt werden können. Dieser Referenzwert wird mit Negativkontrollen eingestellt. Als Negativkontrollen dienen Zellen, die mit Isotypkontrollen bzw. nur mit dem sekundären Antikörper (Ak) markiert sind oder deren spezifische Markierung durch vorheriges Inkubieren mit unkonjugiertem Ak blockiert wurde. Mit diesen Zellen werden dann die Parameter des Gerätes eingestellt. Die Einstellung erfolgt, wenn der FACSCalibur sich im „SETUP-Modus“ befindet, alle Zellen im FSC-SSC-Dot-Plot-Diagramm sichtbar sind und durch Einstellung der Strahlungsintensität des Lasers eine komplette Verteilungskurve im Histogramm der entsprechenden Fluoreszenzwellenlänge erscheint. Die Kurve sollte ungefähr beim Nullpunkt des Diagrammes beginnen. Für die Kompensation der unerwünschten Einstrahlung eines Fluorochroms in den „falschen“ Fluoreszenzkanal kann anteilig ein Spannungswert subtrahiert werden. Dann wird der Modus auf „DATENAUFNAHME“ gestellt und Zellen können aufgenommen und analysiert werden. Die Streulichtsignale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Bei jeder Messung wurden mindestens 30 000 der Zielzellen (in der Regel CD4⁺) gespeichert. Wurden nichtfixierte Zellen gemessen, konnten tote Zellen durch Anfärbung mit PI von der Analyse ausgeschlossen werden. PI kann in tote Zellen durch die beschädigte Zellmembran eindringen und lagert sich in die DNA ein. Lebende Lymphozyten wurden zusätzlich durch ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtintensitäten im Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot) erkannt. Die Auswertung erfolgte auf einem Macintosh-Computer mit Hilfe der „CELLQuest Research Software“ (Becton Dickinson) entweder als einparametrisches

Histogramm oder als zweiparametrisches Diagramm (Dot-Plot), in dem jede Zelle als ein Punkt dargestellt ist.

3.4.2 Oberflächenfärbung

Ca. 1×10^6 - 1×10^7 Zellen wurden jeweils in einem Endvolumen von 100 μ l gefärbt. Bei größeren Zellzahlen wurde das Färbenvolumen entsprechend verändert. Die Färbungen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen, 4ml FACS-Röhrchen oder 1,2 ml Polypropylenröhrchen durchgeführt. Bei längerem Stehen vitaler Zellen im Warmen sammeln sich die Oberflächenmoleküle an einem Pol der Zelle (Capping). Es wurde im Eisbad gearbeitet und alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, um ein Capping und somit verfälschte Signale im Durchflusszytometer zu verhindern. Außerdem wurde versucht, möglichst im Dunkeln zu arbeiten, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

Ca. 1×10^6 - 1×10^7 der aufgereinigten Lymphozyten wurden bei $400 \times g$ 5-8 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch Zugabe von jeweils 1-3 ml PBA und erneutes Zentrifugieren gewaschen, um Mediumreste vollständig zu entfernen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde das Zellpellet 10 Min. bei 4°C mit 20-30 μ g/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2/75) und 100 μ g/ml aufgereinigtem, polyklonalem Ratten-IgG inkubiert. Für Spezifitätskontrollen wurde ein Teil der Proben zusätzlich mit 30-60 μ g/ml anti-TIM-3 (Klon 8H7) oder 30-60 μ g/ml anti-T1/ST2 (Klon3E10) blockiert.

Danach wurden die Primärantikörper zugefügt, gevortext und in einem 100 μ l-Endvolumen für 10 Min. bei 4°C (auf Eis) inkubiert, wobei die Markierung erfolgte. Dann wurde 1-3 ml PBA zupipettiert und ungebundener Ak bei $400 \times g$ 5-8 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit dem Sekundärfarbstoff wiederum für 10 Min. auf Eis inkubiert und 1x mit 1-3 ml PBA gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300-500 μ l PBA aufgenommen und am FACSCalibur analysiert. Sie konnten aber auch in PBS/2% Paraformaldehyd (s. 3.4.3) fixiert und für ca. 2 Wochen im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden. Direkt vor der Messung wurde jeweils 1-2 μ g/ml PI zupipettiert, um tote Zellen zu markieren und sie bei der Analyse ausschließen zu können. PI kann in tote Zellen durch die beschädigte Zellmembran eindringen und lagert sich in die DNA ein. Dieser Schritt entfiel selbstverständlich bei der Messung fixierter Zellen, da diese durch die Fixierung alle tot sind. Als Kontrollen zum Einstellen der Parameter am Durchflusszytometer dienten blockierte Färbungen oder Isotyp-Färbungen. Bei der Isotyp-Kontrolle wurde mit einem an denselben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten aber unspezifischen Ak des gleichen Ig-Isotyps des zu kontrollierenden Ak gefärbt. Als weitere Spezifitätskontrolle dienten Proben, bei denen die spezifische Färbung durch vorheriges Inkubieren mit unkonjugiertem Antikörper blockiert wurde.

3.4.3 Intrazelluläre Färbung

Neben der Möglichkeit, *ex vivo* die Expression von Oberflächenmolekülen zu untersuchen, kann man mit der Durchflusszytometrie auch Informationen über die Expression von sezernierten Proteinen, z.B. Zytokinen, erhalten. Da kaum eine Zelle spontan *ex vivo* Zytokine sezerniert, müssen die zu untersuchenden Zellen zuvor eine Zeit lang *in vitro* entweder spezifisch mit Ag oder unspezifisch mit wachstumsfördernden Substanzen stimuliert werden, damit eine detektierbare Menge produziert wird.

3.4.3.1 Stimulierung der Zellen

Die Zellen wurden für 4h (unspezifisch) bzw. 6h (spezifisch) in KM in einer Konzentration von $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml stimuliert. Innerhalb der ersten 3h nach Stimulation wird eine maximale Zytokinmenge produziert. Nach Ablauf von 2h wurden jeweils 5µg/ml Brefeldin A zugegeben. Brefeldin A verhindert das Zusammensetzen der Hüllen, die bei der Knospung der Transportvesikel am Endoplasmatischen Retikulum benötigt werden und blockiert so den vorwärts gerichteten sekretorischen Vesikeltransport. Auf diese Weise verbleiben synthetisierte Zytokine in der Zelle.

Bei unspezifischer Stimulation wurden die Zellen für 4h mit 5ng/ml Phorbol-myristat-Azetat (PMA) und 1µg/ml Ionomycin stimuliert. PMA ist ein Phorbolster, das aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Diacylglycerol (DAG) die Protein-Kinase C (PKC) stimuliert. Die Aktivierung der PKC durch Phorbolster ist andauernd, da diese nicht so schnell abgebaut werden können wie DAG. Ionomycin ist ein Ionophor, das wegen seines hydrophoben Außenbereichs die Lipiddoppelschicht der Membran von Zellen und Organellen durchdringen und den zytosolischen Calciumspiegel erhöhen kann. Die an der Proliferationsregulation beteiligte PKC wird durch Ca^{2+} und DAG reguliert. Beide Substanzen stimulieren somit die PKC und regen auf diese Weise die Zellproliferation an.

Bei antigenspezifischer Stimulation wurden die Zellen für 6h mit 10µg/ml *T.gondii* Lysat Antigen (TLA) stimuliert.

Anschließend wurden die Zellen geerntet und fixiert.

3.4.3.2 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd

Die Zellen wurden geerntet und bei $400 \times g$ 5-8 Min. abzentrifugiert. Die Zellen wurden analog 3.4.2 für Oberflächenmoleküle gefärbt, gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um Proteinreste zu entfernen. Dann wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 4% (w/v) PFA in PBS vermischt. Die Zellen wurden 20 Min. bei RT fixiert. Anschließend wurde die Fixierung durch Zugabe von PBA beendet und die Zellen erneut abzentrifugiert. Das in 1-2 ml PBA resuspendierte, fixierte Zellpellet kann bis zu 4 Wochen bei 4°C im Dunklen gelagert werden.

3.4.3.3 Intrazelluläre Färbung

Bei einer Kombination aus Oberflächen- und intrazellulärer Färbung, erfolgte zunächst die Oberflächenfärbung der fixierten Zellen mit Sekundärfarbstoff wie in 3.4.2 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Saponinpuffer gewaschen und das Zellpellet mit den intrazellulären Ak in Saponinpuffer 20 Min. bei RT inkubiert. Saponin ist ein Wirkstoff aus Pflanzen, der die Zellmembran permeabilisiert, so daß der Antikörper in die Zelle diffundieren kann. Gebundener Ak-Komplex kann aufgrund seiner Größe nicht mehr aus der Zelle herausdiffundieren. Dann wurden die Zellen zur Entfernung ungebundener Ak ein- bis zweimal mit Saponin-Puffer und abschließend, um geöffnete Poren zu verschließen, einmal mit PBA gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300-500µl PBA aufgenommen und entweder sofort am FACSCalibur analysiert oder bis zur Messung bei 4°C im Dunklen gelagert.

3.4.4 Analyse der Koexpression

Um festzustellen, ob die Koexpression zweier Moleküle (X und Y) koordiniert oder unabhängig voneinander ist, wurde die beobachtete (obs. von engl.: observed) Frequenz mit der erwarteten (exp. von engl.: expected) Frequenz der Koproduzenten miteinander verglichen. Der für zufällige Koinzidenz zweier unabhängiger Variablen erwartete Wert wurde folgendermaßen berechnet:

c	d
a	b

$$\text{exp.} = \frac{(c+d)(b+d)}{100}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{obs.} - \text{exp.})^2}{\text{exp.}}$$

$$\Phi = \frac{(ad - bc)}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}$$

Molekül Y ↑

Molekül X →

Die statistische Signifikanz für die Abweichung des erwarteten vom beobachteten Wert kann über den χ^2 -Test bestimmt werden. Mithilfe des auf diese Weise berechneten ϕ (phi)-Korrelationskoeffizienten wird die Koexpression zweier Moleküle folgendermaßen bewertet:

- 1 < ϕ < -0,1: negative Korrelation
- 0,1 < ϕ < +0,1: stochastisch verteilte Expression/ zufällige Koexpression
- +0,1 < ϕ < +1: bevorzugte Koexpression

Nach (Bishop et al., 1975).

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die TIM-3 Expression auf murinen T-Helfer-Lymphozyten untersucht. TIM-3 wurde in Vorarbeiten von unseren Kooperationspartnern bei Millennium Pharmaceuticals als eines der Moleküle entdeckt, die im Vergleich zu Th2-Zellen auf mRNA-Ebene differenziell verstärkt von Th1-Zellen exprimiert werden. Zu Beginn der Untersuchungen gab es darüber hinaus keine weiteren Informationen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression von TIM-3 auf Proteinebene auf verschiedenen Zellen des Immunsystems und in verschiedenen Organen charakterisiert. Darüber hinaus wurden verschiedene Maus-Inzuchtstämme miteinander verglichen, um zu überprüfen, ob der genetische Hintergrund einen Einfluss auf die Expression von TIM-3 hat. Mit einem Schwerpunkt auf T-Helfer-Zellen wurde die TIM-3 Expression in gesunden Tieren, in Infektionsmodellen und in zwei verschiedenen Modellen für entzündliche Autoimmunerkrankungen untersucht. Im zweiten Teil wurde analysiert, ob die Expression von TIM-3 mit einem Th1-Phänotyp assoziiert werden kann. Im letzten Teil der Arbeit wurde schließlich die Funktion von TIM-3 bei der Differenzierung und bei der Erzeugung von Effektormechanismen muriner Th-Zellen untersucht.

4.1 TIM-3 Expression

4.1.1 Expression von TIM-3 auf verschiedenen Zellpopulationen

Zunächst sollte die Expression auf Proteinebene von TIM-3 auf verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems untersucht werden. Lymphozyten wurden aus der Milz gesunder, unter SPF-Bedingungen gehaltener BALB/c Mäuse isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von TIM-3 analysiert. Es wurden drei verschiedene T-Zell-Populationen (Abb. 4.1) und drei verschiedene Populationen APZ (Abb. 4.2) untersucht. Wie in Abb.4.1 für T-Zellen und in Abb.4.2 für APZ beispielhaft gezeigt, wurde bei der Analyse nach der Exklusion toter Zellen durch Anfärbung mit PI zunächst die gewünschte Population ausgewählt, die in den Abb. 4.1 und 4.2 jeweils rot hervorgehoben wurde (s. 3.4.1). Dabei handelte es sich bei den T-Zellen um $CD3^+ CD4^+$ Th-Zellen, $CD3^+ CD8^+$ ZTL und $CD3^+ \gamma/\delta-TZR^+$ T-Zellen (γ/δ -T-Zellen) und bei den APZ um $MHCII^+ CD19^+$ B-Zellen, $CD11c^+ CD11b^{lo}$ (von engl. : low, niedrig) dendritische Zellen und $CD11c^- CD11b^{hi}$ (von engl.: high, hoch) Makrophagen.

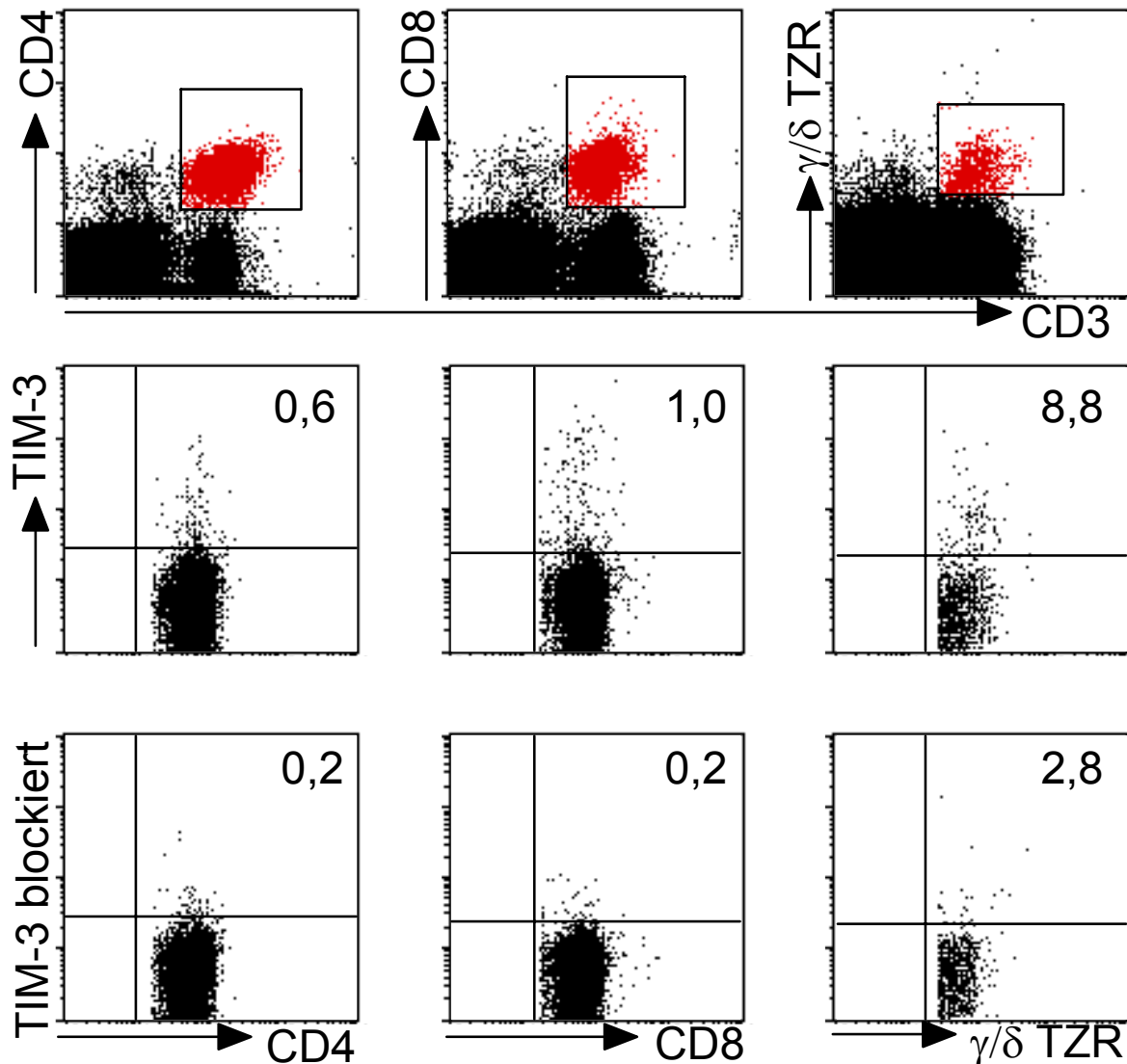


Abb. 4.1: TIM-3 Expression auf T-Zellen. Aus gesunden, unter SPF-Bedingungen gehaltenen BALB/c Mäusen isolierte Splenozyten wurden mit Fluorochrom konjugierten mAk für die Oberflächenexpression von CD3, CD4, CD8, γ/δ -TZR und TIM-3 markiert und durchflusszytometrisch untersucht. In den Dot Plots der oberen Reihe sind lebende Lymphozyten nach PI-Exklusion dargestellt. Auf der x-Achse ist die CD3 Expression und auf der y-Achse die Expression von CD4, bzw. CD8 oder γ/δ -TZR dargestellt. Die in der Spalte darunter ausgewählte Zellpopulation ist jeweils rot hervorgehoben. In der mittleren Reihe wird auf der y-Achse die TIM-3 Expression angezeigt. Als Gegenparameter ist auf der x-Achse CD4 für die ausgewählten CD3⁺ CD4⁺ T-Helfer-Zellen, bzw. CD8 für die CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen, bzw. γ/δ -TZR für die ausgewählten CD3⁺ γ/δ -TZR⁺ γ/δ -T-Zellen aufgetragen. In der unteren Reihe wird jeweils die Spezifitätskontrolle für den darüber liegenden Dot Plot gezeigt, bei der die Markierung TIM-3 exprimierender Zellen mit einem 50 bis 100fachen Überschuss an unkonjugiertem anti-TIM-3 blockiert wurde. Im oberen rechten Quadranten ist jeweils der Anteil koexprimierender Zellen an der ausgewählten Population in Prozent angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

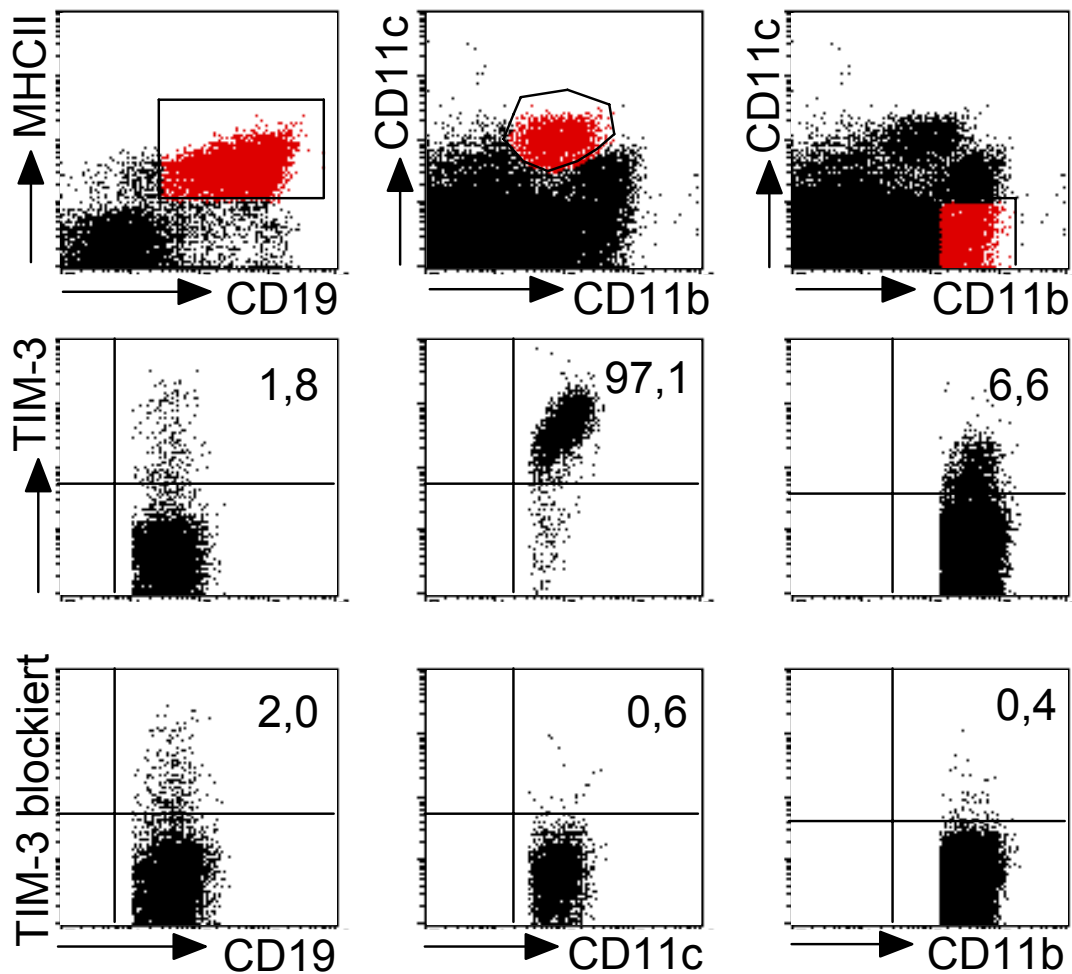


Abb. 4.2: TIM-3 Expression auf APZ. Aus gesunden, unter SPF-Bedingungen gehaltenen BALB/c Mäusen isolierte Splenozyten wurden mit Fluorochrom konjugierten mAk für die Oberflächenexpression von MHCII, CD19, CD11b, CD11c und TIM-3 markiert und durchflusszytometrisch untersucht. In den Dot Plots der oberen Reihe sind lebende Lymphozyten nach PI-Exklusion dargestellt. Die in der Spalte darunter ausgewählte Zellpopulation ist jeweils rot hervorgehoben. In der mittleren Reihe wird auf der y-Achse die TIM-3 Expression angezeigt. Als Gegenparameter ist auf der x-Achse CD19 für die ausgewählten MHCII⁺ CD19⁺ B-Zellen, bzw. CD11c für die CD11b^{lo} CD11c⁺ dendritischen Zellen, bzw. CD11b für die ausgewählten CD11b^{hi} CD11c⁻ Makrophagen aufgetragen. In der unteren Reihe wird jeweils die Spezifitätskontrolle für den darüber liegenden Dot Plot gezeigt, bei der die Markierung TIM-3 exprimierender Zellen mit einem 50 bis 100fachen Überschuss unkonjugierten anti-TIM-3 blockiert wurde. Im oberen rechten Quadranten ist jeweils der Anteil koexprimierender Zellen an der ausgewählten Population in Prozent angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Auf allen untersuchten T-Zellpopulationen konnte die Expression von TIM-3 nachgewiesen werden. Der ermittelte Anteil markierter TIM-3⁺ Zellen ist zwar sehr niedrig, lässt sich jedoch, wie in Abb. 4.1 gezeigt, spezifisch mit einem 50 bis 100fachen Überschuss an unkonjugiertem anti-TIM-3 Antikörper blockieren. Die spezifische Blockierung war ebenso

effektiv, wenn der Fluorochrom konjugierte anti-TIM-3 Antikörper vor der Zellmarkierung mit TIM-3 Fusionsprotein inkubiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Abb. 4.2 zeigt, dass zwar ein Teil der MHCII⁺ CD19⁺ B-Zellen mit anti-TIM-3 markiert werden kann, diese Markierung wird jedoch nicht durch vorheriges Blockieren mit unkonjugiertem anti-TIM-3 beeinträchtigt und ist deshalb unspezifisch. B-Zellen in der Milz gesunder, unter SPF-Bedingungen gehaltener BALB/c Mäuse exprimieren somit kein mit der verwendeten Methode detektierbares TIM-3 auf ihrer Oberfläche. Die TIM-3 Markierung der CD11c⁺ CD11b^{lo} dendritischen Zellen sowie der CD11c⁻ CD11b^{hi} Makrophagen ist dagegen spezifisch und kann durch unkonjugierten anti-TIM-3 Antikörper blockiert werden. Abb. 4.2 zeigt, dass Zellen, die TIM-3⁺ CD11c⁺ sind, diagonal im oberen Quadranten liegen. Wie an der blockierten Kontrolle gezeigt wird, liegt dieser Effekt nicht an einer fehlerhaften Kompensation der Einstellungen am Durchflusszytometer. CD11c⁺ CD11b^{lo} dendritische Zellen, die CD11c stark exprimieren, haben auch am meisten TIM-3 auf ihrer Oberfläche.

In Tab. 4.1 werden die in verschiedenen Versuchen erhaltenen Daten zusammengefasst. Dabei wurde jeweils der Hintergrund der jeweiligen Spezifitätskontrolle vom Wert für den prozentualen Anteil TIM-3⁺ Zellen abgezogen. Die so erhaltenene spezifische Expression ist in Tab. 4.1 als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

	<u>Th-Zellen</u> (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	<u>ZTL</u> (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	<u>γ/δ-T-</u> <u>Zellen</u> (CD3 ⁺ γ/δ- TZR ⁺)	<u>B-Zellen</u> (MHCII ⁺ CD19 ⁺)	<u>dendritische</u> <u>Zellen</u> (CD11b ^{lo} CD11c ⁺)	<u>Makrophagen</u> (CD11b ^{hi} CD11c ⁻)
% TIM-3 ⁺ :	0,5 +/- 0,4 (n=12)	0,5 +/- 0,2 (n=12)	3,6 +/- 2,2 (n=3)	0 (n=6)	80,2 +/- 9,7 (n=12)	5,2 +/- 5,1 (n=12)

Tab. 4.1: TIM-3 Expression auf Splenozyten. In dieser Tabelle werden die in 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ermittelten Daten zusammengefasst. Angegeben ist jeweils der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen in der Milz gesunder, unter SPF-Bedingungen gehaltener BALB/c Mäuse in Prozent der angegebenen Population abzüglich der Spezifitätskontrolle als Mittelwert +/- Standardabweichung. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Proben angegeben.

Die für γ/δ-T-Zellen und Makrophagen erhaltenen relativ hohen Standardabweichungen könnten an einer biologischen Variabilität liegen. Es fällt jedoch auf, dass diese beiden Populationen im Verhältnis zu den anderen untersuchten Zellarten schlechter abgegrenzt sind. Vermutlich führt die daraus resultierende höhere Ungenauigkeit bei der Auswahl dieser Populationen zu den höheren Standardabweichungen.

In der Milz gesunder, unter SPF-Bedingungen gehaltener BALB/c Mäuse liegt der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen bei den Th-Zellen und den CD8⁺ T-Zellen jeweils unter 1%. Ein etwas höherer Anteil der Makrophagen und der γ/δ-T-Zellen exprimiert TIM-3. Auf der

Zelloberfläche von B-Zellen wurde keine detektierbare Expression von TIM-3 gemessen. Die meisten (>75%) dendritischen Zellen in der Milz gesunder SPF-Mäuse exprimieren TIM-3. Somit sind neben CD4⁺ T-Helfer-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen und γ/δ -T-Zellen in der Lage, TIM-3 auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Die Expression von TIM-3 ist jedoch nicht auf T-Zellen beschränkt. Darüber hinaus wird TIM-3 auch von professionellen APZ, und zwar von einem Teil der Makrophagen und der Mehrheit der dendritischen Zellen, in der Milz exprimiert. TIM-3 wird somit nicht spezifisch nur von einer bestimmten T-Zellpopulation exprimiert, sondern kann auch von anderen T-Zellpopulationen und einem Teil der APZ des Immunsystems gebildet werden.

Da TIM-3 bei der Suche nach differenziell von Th1- und Th2-Zellen exprimierten Genen gefunden wurde, wurde bei den folgenden Analysen der Schwerpunkt auf die Untersuchung der TIM-3 Expression auf T-Zellen, insbesondere auf T-Helfer-Zellen gelegt.

4.1.2 TIM-3 Expression auf T-Zellen in verschiedenen Organen und unterschiedlichen Inzuchtstämmen

Der genetische Hintergrund einer Maus beeinflusst die von ihr erzeugte Immunantwort auf Pathogene und ihre Suszeptibilität für autoimmune Erkrankungen (s. 1.5). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Expression von TIM-3 auf CD4⁺ Th-Zellen und CD8⁺ T-Zellen durch den genetischen Hintergrund beeinflusst wird. Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob T-Zellen, die aus verschiedenen Geweben isoliert wurden, einen unterschiedlichen Anteil TIM-3 exprimierender Zellen aufweisen. Deshalb wurde die TIM-3 Expression auf Th-Zellen und CD8⁺ T-Zellen aus verschiedenen Organen unterschiedlicher Mausstämmen miteinander verglichen.

Neben Mäusen der Inzuchtstämme BALB/c und C57BL/6 wurden Tiere der Inzuchtstämme AKR, DBA/1 und DBA/2 untersucht. Am gebräuchlichsten bei der immunologischen Charakterisierung von Inzuchtstämmen ist die Nennung des MHC-Haplotyps. BALB/c und DBA/2 Mäuse haben einen H-2^d Haplotyp, C57BL/6 besitzen den H-2^b, AKR den H-2^k und DBA/1 den H-2^q Haplotyp. AKR und DBA/1 Mäuse sind suszeptibel für bestimmte Arthritis-erkrankungen, während BALB/c und C57BL/6 Mäuse dies nicht sind. DBA/2 Mäuse sind resistent in einem murinen Asthmamodell, AHR (engl.: airway hyperreactivity), weil sie unter anderem eine verminderte IL-4 Produktion zeigen. C57BL/6 Mäuse sind suszeptibel für eine orale Infektion mit dem Protozoon *Toxoplasma gondii*, dagegen sind BALB/c Mäuse resistent gegen solch eine Infektion (Liesenfeld, 1999).

Lymphozyten wurden, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, aus den angegebenen Organen der Mäuse isoliert, mit Fluorochrom konjugierten Antikörpern markiert und am Durchflusszytometer untersucht. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit PI aus der anschließenden Analyse ausgeschlossen (s. 3.4.1). In Tab. 4.2 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Mausstamm:		BALB/c	C57BL/6	AKR	DBA/1	DBA/2
Organ:		(H-2 ^d Haplotyp)	(H-2 ^b Haplotyp)	(H-2 ^k Haplotyp)	(H-2 ^q Haplotyp)	(H-2 ^d Haplotyp)
Milz	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	0,5 +/- 0,4 (n=12)	0,8 +/- 0,3 (n=8)	0,6 +/- 0,2 (n=7)	1,8 +/- 0,9 (n=6)	1,0 (n=2)
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	0,5 +/- 0,2 (n=12)	0,9 +/- 0,6 (n=6)	n.u.	0,5 +/- 0,0 (n=3)	0,7 (n=2)
Lymphknoten	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	0,2 +/- 0,2 (n=6)	1,2 +/- 1,8 (n=4)	0,2 +/- 0,1 (n=7)	0,9 +/- 0,3 (n=5)	0,6 (n=2)
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	0,3 +/- 0,2 (n=6)	1,9 +/- 2,7 (n=2)	n.u.	0,1 (n=2)	0,7 (n=2)
Blut	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	0,2 +/- 0,2 (n=6)	n.u.	n.u.	0,6 +/- 0,6 (n=6)	0,8 (n=2)
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	0,2 +/- 0,1 (n=6)	n.u.	n.u.	0,1 +/- 0,0 (n=3)	0,1 (n=2)
Thymus	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	0,2 +/- 0,2 (n=3)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	0,3 +/- 0,4 (n=3)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Leber	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	0,6 +/- 0,2 (n=4)	0,6 +/- 0,4 (n=4)	n.u.	n.u.	n.u.
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	0,9 +/- 0,6 (n=4)	3,2 (n=2)	n.u.	n.u.	n.u.
DD-IEL	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	7,3 (n=2)	2,6 +/- 2,1 (n=4)	n.u.	n.u.	n.u.
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	0,7 (n=2)	0,5 (n=2)	n.u.	n.u.	n.u.
DD-LPL	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	3,7 (n=2)	1,2 +/- 0,7 (n=4)	n.u.	n.u.	n.u.
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	1,1 +/- 1,0 (n=3)	0,7 (n=2)	n.u.	n.u.	n.u.
Knochenmark	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	1,4 (n=1)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	% TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD8 ⁺ :	2,4 (n=1)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Tab. 4.2: Vergleich der TIM-3 Expression auf T-Zellen in verschiedenen Organen und zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen. Die TIM-3 Expression auf T-Zellen von BALB/c, C57BL/6, AKR, DBA/1 und DBA/2 Mäusen wurde miteinander verglichen. Hierfür wurden Lymphozyten aus der Milz, aus Lymphknoten (BALB/c, DBA/1, DBA/2: inguinal, axial, mesenterial, periaortal; C57BL/6: mesenterial; AKR: periaortal, popliteal) und bei einigen Stämmen aus Blut, Thymus, gespülter Leber, Knochenmark und Dünndarm (DD-IEL und DD-LPL) isoliert und durchflusszytometrisch die Expression von TIM-3 auf CD3⁺ CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th) bzw. CD3⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht. Angegeben ist jeweils der Mittelwert mit, soweit möglich, Standardabweichung und in Klammern die Anzahl der untersuchten Proben (n.u.= nicht untersucht).

Wie bei Tab. 4.1 wurde zunächst der Hintergrund der jeweiligen Spezifitätskontrolle vom Wert für den prozentualen Anteil TIM-3⁺ Zellen abgezogen. In Tab. 4.2 ist die so erhaltene spezifische Expression als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Der in Klammern angegebene Wert entspricht der Anzahl der untersuchten Proben, der nicht immer der Gesamtzahl der untersuchten Tiere entspricht. Für Leber und Darm wurden die Lymphozyten aus den jeweils vereinigten Organen mehrerer Mäuse isoliert, damit eine für die Untersuchung ausreichende Anzahl an Zellen zur Verfügung stand. In der Regel wurden

zur Gewinnung hepatischer Lymphozyten die Lebern von drei Mäusen vereinigt. Zur Gewinnung einer ausreichenden Anzahl an Lymphozyten für eine Untersuchung der IEL- und LPL-Fraktionen wurden die Dünndärme von jeweils drei Mäusen gemeinsam untersucht. Bei den einzelnen Stämmen wurden zum Teil unterschiedliche Lymphknoten miteinander verglichen. Für BALB/c Mäuse, DBA/1 Mäuse und DBA/2 Mäuse wurden die inguinalen, axialen, mesenterialen und periaortalen Lymphknoten einzelner Mäuse jeweils vereint. Bei C57BL/6 Mäusen wurden nur die mesenterialen Lymphknoten von jeweils drei Mäusen vereinigt und bei AKR Mäusen die periaortalen und poplitealen Lymphknoten von jeweils zwei bis drei Tieren. Da es zwischen den Gruppen jedoch keinen signifikanten Unterschied gibt, werden sie in der Tabelle miteinander als Lymphknoten verglichen.

Bei allen untersuchten Stämmen ist der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen in den sekundären lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten sehr gering und liegt bei ca. 0,1 bis 1,5% sowohl innerhalb der Population der T-Helfer-Zellen als auch der CD8⁺ T-Zellen. Es besteht somit kein Unterschied in der Expression von TIM-3 auf T-Zellen aus Lymphknoten unterschiedlichen Ursprungs. Die Expression auf T-Zellen aus Blut, Thymus und Knochenmark liegt ebenfalls in diesem Bereich und ist in den untersuchten Stämmen in etwa gleich. Die genetische Varianz zwischen diesen Stämmen scheint somit die TIM-3 Expression von T-Helfer-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen nicht zu beeinflussen. Bei Lymphozyten, die aus dem nichtlymphatischen Organ Leber isoliert wurden, sind die Werte, soweit untersucht, ähnlich niedrig. Es wurde jedoch ein geringfügig höherer Anteil TIM-3⁺ T-Helfer-Zellen bei IEL und LPL aus dem Dünndarm (2-7%) gefunden. Somit scheint es leichte Unterschiede in der anatomischen Lokalisation der TIM-3 Expression auf T-Helfer-Zellen zu geben. Soweit untersucht, wurde ein leicht erhöhter Anteil TIM-3 exprimierender Zellen an den T-Helfer-Zellen aus darmassoziiertem Gewebe beobachtet.

Mit diesen Untersuchungen konnten erste Erkenntnisse über die Expression von TIM-3 in verschiedenen immunologischen Organen gewonnen werden. Im gesunden, unbehandelten Tier ist die Expression von TIM-3 sowohl auf Th- als auch auf CD8⁺ T-Zellen im Blut, den primären lymphatischen Organen Thymus und Knochenmark, den sekundären lymphatischen Organen Lymphknoten und Milz und dem nichtlymphatischen Organ Leber sehr gering (ca. 0,1 bis 1,5%). Diese Expression ist, soweit untersucht, bei den untersuchten Mausstämmen vergleichbar und scheint nicht vom genetischen Hintergrund der Maus beeinflusst zu sein.

4.1.3 Einfluss von Infektionen auf die TIM-3 Expression

Nach der Untersuchung gesunder Mäuse, sollte in verschiedenen Infektionsmodellen erforscht werden, wie die TIM-3 Expression während einer Immunantwort *in vivo* verläuft. Es wurden ein Th2-dominiertes Infektionsmodell und zwei von unterschiedlichen Erregerklassen

verursachte Th1-dominierte Modelle gewählt, um die TIM-3 Expression auf T(h)-Zellen während verschiedener Immunantworten *ex vivo* zu verfolgen. Die verwendeten Modelle wurden bereits unter 1.5 eingeführt. Die TIM-3 Expression auf T-Zellen wurde nach der Infektion mit der in nichtinfizierten Kontrolltieren verglichen. Es sollte untersucht werden, ob und wie sich durch die Infektion mit unterschiedlichen Erregern in Mäusen die Expression des TIM-3 Moleküls auf T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten und in von der Infektion betroffenen Organen verändert.

4.1.3.1 Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii*

Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob TIM-3 von *in vivo* differenzierten Th1-Zellen exprimiert wird. C57BL/6 Mäuse wurden mittels Gavage mit jeweils 10 Zysten des *T. gondii* Stamms ME49 oral infiziert. Lymphozyten wurden aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten (mesLN), der Leber und dem Dünndarm (DD-IEL und DD-LPL) nichtinfizierter Kontrollen und 6, 9, 14 und 30 Tage nach der Infektion gewonnen und am Durchflusszytometer auf die Expression von TIM-3 auf CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen untersucht. Ein Teil der Zellen wurde für vier Stunden mit PMA/ Ionomycin stimuliert, und anschließend wurde der Anteil der IFN- γ Produzenten durch intrazelluläre Durchflusszytometrie ermittelt. In Abb. 4.3 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die spezifische Zytokinantwort wurde ebenfalls untersucht und wird an anderer Stelle besprochen (s. 4.2.2.2).

Bei nichtinfizierten Tieren wird TIM-3 in allen untersuchten Organen nur von einem kleinen Anteil der T-Zellen exprimiert. Schon 6 Tage nach einer Infektion mit *T. gondii* erhöht sich der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen in der Leber von unter 1% bis auf über 5% der Th-Zellen und auch der CD8⁺ T-Zellen. In darmassoziiertem Gewebe (DD-IEL/ DD-LPL) steigt der Anteil TIM-3⁺ Zellen in diesem Zeitraum auf mehr als 10% der Th-Zellen und ca. 8-10% der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4.3 A und B). Von Tag 6 bis Tag 9 nach der Infektion wird ein dramatischer Anstieg der TIM-3 Expression auf Th-Zellen in allen untersuchten Organen beobachtet. In der Milz und bei den DD-LPL exprimiert die Hälfte der Th-Zellen TIM-3, in den mesLN ist ein Drittel der Th-Zellen TIM-3⁺, drei Viertel aller Th-Zellen in der Leber und ungefähr 70% der DD-IEL Th-Zellen sind TIM-3⁺. Auch bei den CD8⁺ T-Zellen ist die Expression von TIM-3 an Tag 9 in Milz und Leber stark erhöht. Bei den CD8⁺ T-Zellen in den mesLN und den darmassoziierten Geweben ist der Anstieg des Anteils TIM-3⁺ Zellen nicht so stark wie bei den Th-Zellen, aber auch dort wird ein Anstieg der Expression beobachtet. Von Tag 9 bis Tag 14 nimmt der Anteil TIM-3⁺ Zellen in allen untersuchten Organen wieder ab, ist jedoch an Tag 14 immer noch höher als bei nichtinfizierten Tieren. Selbst 30 Tage nach der Infektion ist die Frequenz TIM-3⁺ T-Zellen in allen untersuchten Organen höher als bei nichtinfizierten Tieren.

Die IFN- γ Produktion der Th-Zellen nach der Infektion verläuft ähnlich wie die TIM-3 Expression dieser Zellen. Der Anteil IFN- γ produzierender Zellen der CD4⁺ T-Zellen steigt mit einer vergleichbaren Kinetik bis Tag 9 nach Infektion in allen untersuchten Organen stark an und nimmt von Tag 9 bis Tag 14 wieder ab. Der Anteil IFN- γ produzierender CD4⁺ Th-Zellen ist jedoch an Tag 9 in den darmassoziierten Fraktionen geringer als der Anteil TIM-3⁺ Zellen der CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen. Bei den DD-IEL exprimieren ungefähr 20% und bei den DD-LPL ca. die Hälfte mehr der CD4⁺ Th-Zellen TIM-3, als CD4⁺ Th-Zellen in der Lage sind, IFN- γ herzustellen.

Zum ersten Mal wurde die Expression von TIM-3 auf T-Zellen in Mäusen nach einer Infektion untersucht. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich der prozentuale Anteil TIM-3⁺ Zellen unter den Th-Zellen und den CD8⁺ T-Zellen in den untersuchten Geweben nach einer oralen Infektion mit dem einzelligen Parasiten *T. gondii* sehr stark erhöht, ungefähr an Tag 9 nach Infektion Maximalwerte erreicht und anschließend wieder abnimmt. Die Infektion von Mäusen mit dem Protozoon *T. gondii* führt somit zu einer stark erhöhten Frequenz TIM-3 exprimierender Th- und CD8⁺ T-Zellen die von einer Erhöhung des Anteils IFN- γ produzierender Th-Zellen begleitet wird.

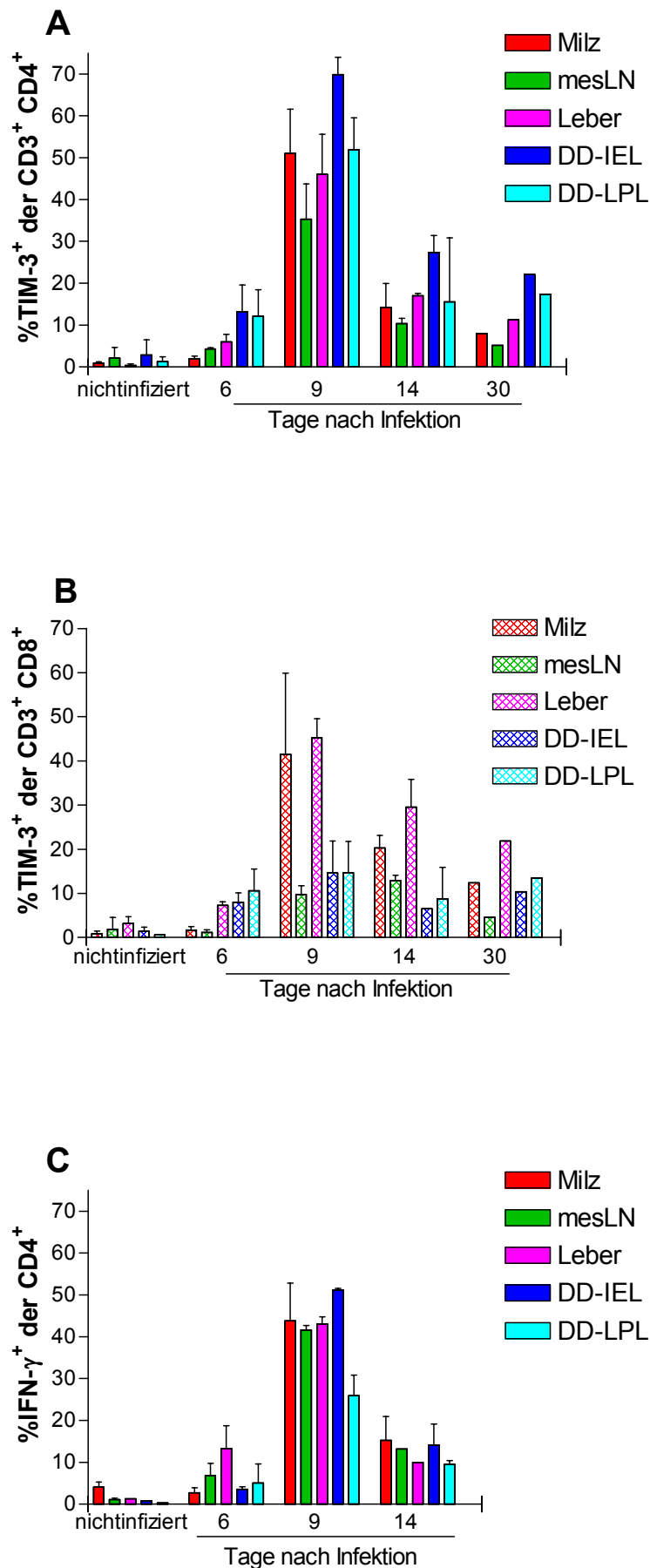


Abb. 4.3: Kinetik der TIM-3 Expression und der IFN- γ Produktion von T-Zellen nach einer Infektion mit *Toxoplasma gondii*.

Dargestellt ist die TIM-3 Expression in C57BL/6 Mäusen von CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen (A) und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (B) sowie der Anteil IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen (C) vor und nach einer Infektion mit *T. gondii*. Lymphozyten von je 3 C57BL/6 Mäusen pro Zeitpunkt wurden aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten (mesLN), der Leber und dem Dünndarm (DD-IEL und DD-LPL) isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von TIM-3, CD3 und CD4 bzw. CD8 untersucht. Ein Teil der Zellen wurde für 4h mit PMA/Ionomycin *in vitro* stimuliert. Nach 2 Stunden wurde Brefeldin A zur Sekretionshemmung hinzugefügt. Die Zellen wurden für die Oberflächenexpression von CD4 und nach Fixierung für intrazelluläres IFN- γ markiert. Gezeigt ist auf der y-Achse der Anteil TIM-3⁺ Zellen der CD3⁺ CD4⁺ (A) bzw. CD3⁺ CD8⁺ (B) Lymphozyten nach PI-Exklusion bzw. der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen der CD4⁺ Zellen (C). Auf der x-Achse ist jeweils der Zeitpunkt angegeben. Dargestellt ist bis auf Tag 30 jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 Tieren pro Gruppe.

4.1.3.2 Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes*

Die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ist eines der am besten charakterisierten Infektionsmodelle für intrazelluläre, bakterielle Krankheitserreger. In den letzten Jahren konnten die immundominanten Epitope verschiedener Listerien-Proteine charakterisiert werden, die im Verlauf einer *L. monocytogenes*-Infektion von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Lösliche MHC-Klasse-I/Peptid-Komplexe (MHC-Klasse-I-Tetramere) ermöglichen die quantitative Charakterisierung der spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten-Antwort (s. 1.5.2). Die TIM-3 Expression von CD4⁺ Th- und CD8⁺ T-Zellen nach einer intravenösen Primärinfektion (Abb. 4.4) und nach einer oralen Sekundärinfektion (Abb. 4.5) mit *L. monocytogenes* wurde in BALB/c Mäusen untersucht. Mit Hilfe von löslichen MHC-Klasse-I/LLO₉₁₋₉₉ Peptid-Komplexen (MHC-Klasse-I-Tetramere) konnte die für ein immundominantes listerielles Antigen spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort quantitativ verfolgt werden (s. 1.5.2). Für die Primärinfektion wurden BALB/c Mäuse intravenös mit $2,6 \times 10^{+3}$ *L. monocytogenes*, Stamm EGD Serovar 1/2a infiziert und 9, 13 oder 21 Tage später untersucht. Für die Sekundärinfektion wurden BALB/c Mäuse zunächst intravenös mit $2 \times 10^{+3}$ *L. monocytogenes* infiziert und 11 bis 12 Wochen später oral mittels Gavage mit $2 \times 10^{+9}$ *L. monocytogenes* infiziert und 3, 7 und 10 Tage danach untersucht. Hierfür wurden Lymphozyten aus den angegebenen Organen von infizierten Mäusen und nichtinfizierten Kontrollen isoliert, mit Fluorochrom konjugierten Antikörpern und MHC-Klasse-I/LLO₉₁₋₉₉ Tetramerkonstrukten markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit PI ausgeschlossen. In Abb. 4.4 sind die nach der Primärinfektion erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen ist 9 Tage nach einer intravenösen Primärinfektion mit *L. monocytogenes* in der Milz auf den CD8⁺ T-Lymphozyten leicht, um das zwei- bis vierfache, im Vergleich zu den nichtinfizierten Kontrollen erhöht und liegt bei ca. 4,5% der CD8⁺ T-Zellen (Abb.4.4 B). Von Tag 9 bis Tag 13 sinkt die Frequenz wieder auf das Niveau der Kontrollen. Der Anteil der gegen das immundominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ spezifischen Zellen an der Gesamtpopulation der CD8⁺ T-Zellen liegt 9 Tage nach der Infektion bei 3 bis 3,5% und nimmt danach ebenfalls ab (Abb.4.4 C). Die TIM-3 Expression auf CD8⁺ T-Zellen der Milz hat somit einen ähnlichen Verlauf wie die gegen das immundominante Epitop des LLO gerichtete spezifische Antwort der CD8⁺ T-Zellen nach einer intravenösen Primärinfektion mit *L. monocytogenes*. Die Expression von TIM-3 auf den Th-Zellen in der Milz ist nach systemischer Infektion fast unverändert (Abb. 4.4 A). Der Anteil TIM-3⁺ Zellen liegt am Tag 9 zwischen 1 und 1,5% der CD4⁺ Th-Zellen und ist somit etwas höher als bei nichtinfizierten Tieren. Dieser Unterschied liegt jedoch nur knapp außerhalb des Variabilitätsbereichs der Standardabweichungen. 13 und 21 Tage nach Infektion liegt der Anteil wieder auf dem Niveau von nichtinfizierten Tieren. Somit hat die intravenöse

Primärinfektion mit *L. monocytogenes* keinen ermittelbaren Einfluss auf die Expression des TIM-3 Moleküls auf Th-Zellen in der Milz.

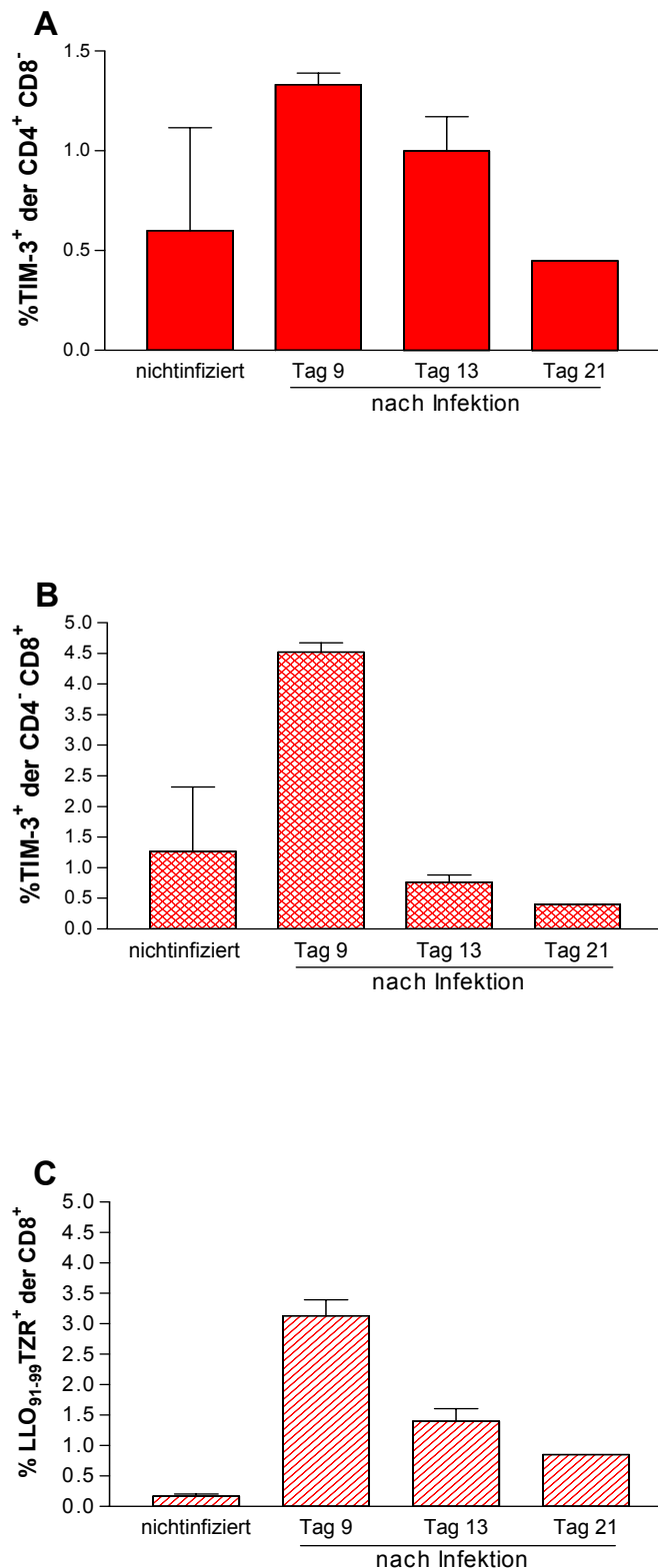


Abb. 4.4: Kinetik der TIM-3 Expression auf T-Zellen nach einer primären Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Auf Splenozyten aus BALB/c Mäusen vor (n=4) und 9 (n=3), 13 (n=3), 21 (n=2) Tage nach Primärinfektion mit *L. monocytogenes* wurde durchflusszytometrisch die Expression von CD4, CD8 und TIM-3 untersucht. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung für die Frequenz TIM-3⁺ Zellen der CD4⁺ CD8⁻ Th-Zellen (A) bzw. der CD4⁻ CD8⁺ T-Zellen (B). Mit Hilfe von H2-K^d-LLO₉₁₋₉₉ Tetramerkonstrukten wurde der Anteil der für ein listerielles immundominantes Epitop spezifischen CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (C). Gezeigt ist bis auf Tag 21 der Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils 3 bis 4 Tieren pro Zeitpunkt.

Im Folgenden wurde die Expression von TIM-3 auf T-Zellen nach einer oralen Sekundärinfektion mit *L. monocytogenes* in Mäusen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse

sind in Abb. 4.5 dargestellt.

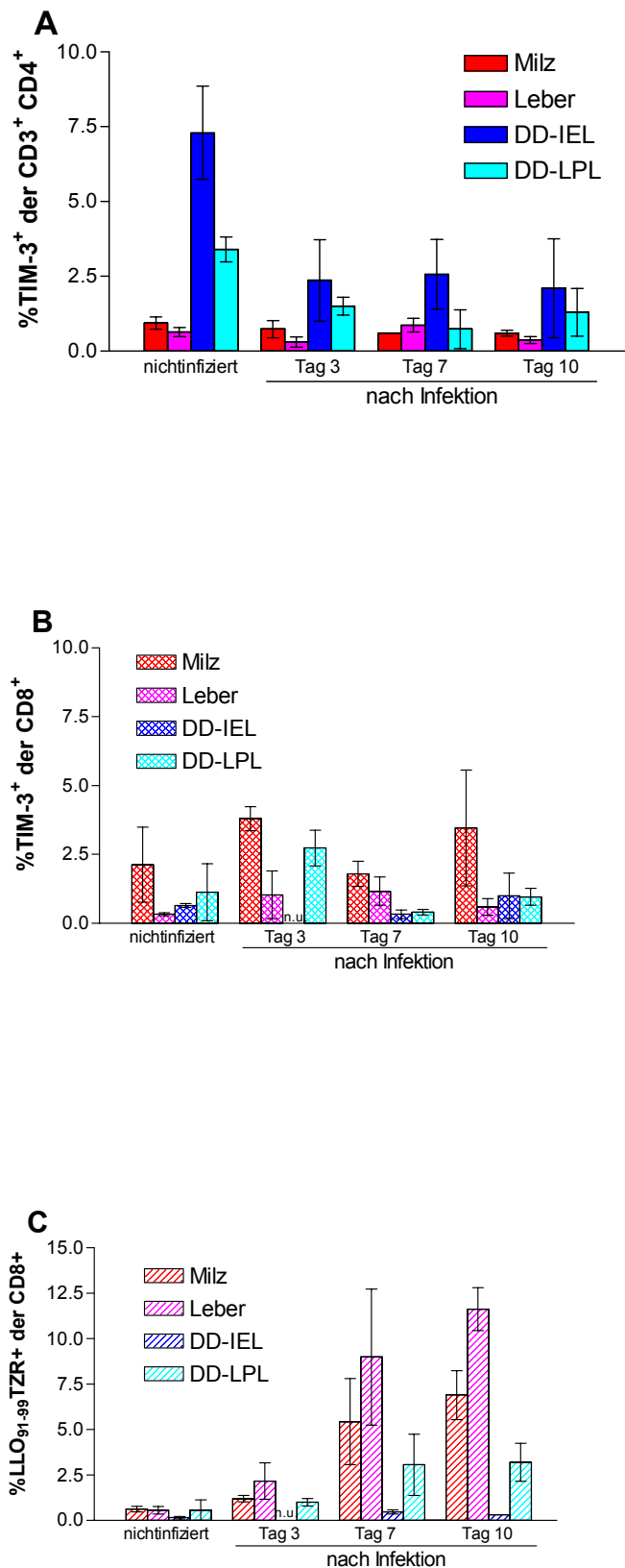


Abb. 4.5: Kinetik der TIM-3 Expression auf T-Zellen nach einer sekundären Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Aus nichtinfizierten BALB/c Mäusen und 3, 7 und 10 Tage nach einer *p.o.* Sekundärinfektion mit *L. monocytogenes* wurden Lymphozyten aus der Milz, der Leber und dem Dünndarm (DD-IEL und DD-LPL) isoliert und durchflusszytometrisch der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen der CD3⁺/CD4⁺ T-Helfer-Zellen (A) und der CD8⁺ T-Zellen (B) bestimmt. Mit Hilfe von H2-K^d-LLO₉₁₋₉₉ Tetramerkonstrukten wurde der Anteil der für ein listerielles immundominantes Epitop spezifischen CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (C). Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils 3 Tieren pro Zeitpunkt (n.u.: nicht untersucht).

Nach einer oralen Sekundärinfektion mit *L. monocytogenes* sinkt der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen unter den CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen in der Dünndarm-IEL-Fraktion von 7,5% bei nichtinfizierten Tieren auf ca. 2,5% drei bis zehn Tage nach der Infektion und in der Dünndarm-LPL-Fraktion von 3,5% auf ca. 1,5% (Abb. 4.5 A). In Milz und Leber bleibt er unverändert. Bei den CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen erhöht sich der Anteil bei den DD-LPL nach 3 Tagen leicht von ca. 1% auf ca. 2,7%, nach sieben Tagen liegt er wieder im Bereich der naiven Kontrollen (Abb. 4.5 B). Der Anteil LLO₉₁₋₉₉ spezifischer CD8⁺ T-Zellen steigt nach Sekundärinfektion in Milz, Leber und DD-LPL an, womit sichergestellt wurde, dass die untersuchten Tiere infiziert waren (Abb. 4.5 C).

Somit erhöht sich nach einer primären intravenösen Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* der Anteil TIM-3⁺ Zellen unter den CD8⁺ T-Zellen der Milz geringfügig um das zwei- bis vierfache, unter den CD4⁺ Th-Zellen ist er kaum verändert. Nach einer oralen Sekundärinfektion bleiben die Frequenzen TIM-3⁺ Zellen unter den CD4⁺ Th-Zellen und den CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber unverändert. In der Lamina Propria des Dünndarms ist 3 Tage nach der Sekundärinfektion der Anteil TIM-3⁺ der CD8⁺ T-Zellen geringfügig höher als bei nichtinfizierten Tieren. Die Infektion von Mäusen mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* verändert die Frequenz der TIM-3 exprimierenden Th- und CD8⁺ T-Zellen nur wenig oder gar nicht. Sowohl bei einer primären als auch bei einer sekundären Gedächtnis-Immunantwort liegen die beobachteten Unterschiede in Bereichen unter 5% der jeweils betrachteten Gesamtpopulation.

4.1.3.3 Infektion mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis*

BALB/c Mäuse wurden subkutan mit Larven im L3 Stadium von *N. brasiliensis* infiziert und 13 bis 14 Tage nach der Infektion durchflusszytometrisch auf die TIM-3 Expression auf CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen Milz und mediastinalen Lymphknoten und in der Lunge, wo sich die durch die Lungenwanderung des Wurmes hervorgerufene Hauptreaktion gegen den Parasiten abspielt, untersucht. In Tab. 4.3 werden die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst und mit den Daten nichtinfizierter BALB/c Mäuse verglichen.

	nichtinfiziert	infiziert mit <i>N. brasiliensis</i>
Milz	0,5 +/- 0,4 (n=12)	1,0 +/- 0,9% (n=3)
Lymphknoten	0,2 +/- 0,2 (n=6)	0,3 (n=1)
Lunge	0,9 (n=1)	3,5 +/- 2,1 (n=3)

Tab. 4.3: TIM-3 Expression nach Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*. Aus gesunden, unter SPF-Bedingungen gehaltenen BALB/c Mäusen und 13 oder 14 Tage nach einer subkutanen Infektion mit dem Nematoden *N. brasiliensis* wurden Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Lunge isoliert und die Expression von TIM-3 auf CD3⁺ CD4⁺ T-Helfer-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung TIM-3⁺ der CD3⁺ CD4⁺ Zellen und in Klammern die Anzahl der untersuchten Proben.

In der Lunge infizierter Tiere exprimiert ein etwas höherer Anteil von ca. 3,5% der CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen TIM-3 im Vergleich zu nichtinfizierten Tieren mit weniger als 1% TIM-3⁺ Th-Zellen (Tab. 4.3). In den sekundären lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten ist kein Unterschied in der TIM-3 Expression auf Th-Zellen zwischen nichtinfizierten und infizierten Mäusen erkennbar. Nach einer Infektion mit dem Helminthen *N. brasiliensis* ist somit die Frequenz TIM-3⁺ CD4⁺ Th-Zellen in der Peripherie unverändert und im Zielorgan Lunge geringfügig erhöht.

Von den untersuchten Infektionsmodellen führt lediglich die Infektion mit dem Protozoon *T. gondii* zu einer sehr stark erhöhten TIM-3 Expression sowohl auf CD4⁺ Th- als auch auf CD8⁺ T-Zellen. Nach einer Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* ist die Frequenz der TIM-3 exprimierenden T-Zellen kaum bis geringfügig erhöht. Auch nach einer Helminthen Infektion mit *N. brasiliensis* wurden geringfügig erhöhte Frequenzen TIM-3 exprimierender Th-Zellen im Zielorgan Lunge jedoch nicht in Milz oder Lymphknoten gemessen. Somit ist die Anregung einer Immunantwort durch eine Infektion allein nicht ausreichend, um die Frequenz TIM-3 exprimierender T-Zellen stark zu erhöhen. Die Natur des Pathogens hat also vermutlich einen starken Einfluss auf die Expression des TIM-3 Moleküls auf T-Zellen.

4.1.4 Einfluss von Entzündungen auf die TIM-3 Expression

Neben der Expression von TIM-3 auf T-Zellen nach einer Infektion interessierte auch die Expression von TIM-3 auf T-Zellen bei Autoimmunkrankheiten, die Entzündungsreaktionen verursachen. Es wurden zwei verschiedene murine Modelle für menschliche Autoimmunerkrankungen untersucht, ein murines Modell für Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) und ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes, neues Modell für Arthritis.

4.1.4.1 Arthritis

In einem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Arthritismodell wurde die TIM-3 Expression bei kranken und gesunden Tieren miteinander verglichen (s. 1.6.1). Hierfür wurden Lymphozyten aus den Milzen von DBA/1 Mäusen gewonnen, welche aufgrund einer Immunisierung mit GPI in Adjuvans eine Arthritis entwickelt hatten. Zum Vergleich wurden Milzen von 12 gesunden DBA/1, welche lediglich mit PBS in Adjuvans behandelt worden waren, vereinigt und außerdem gesunde, unbehandelte DBA/1 Mäuse mitgeführt. Die Zellen wurden *ex vivo* mit Fluorochrom konjugierten Antikörpern markiert und die Expression von TIM-3, CD3 und CD4 am Durchflusszytometer analysiert. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit PI von der Analyse ausgeschlossen. Der prozentuale Anteil TIM-3⁺ Zellen der

lebenden CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen wurde auf diese Weise ermittelt. In Tab. 4.4 sind die erhaltenen Daten zusammengefasst.

	naiv	PBS/ Adjuvans	GPI/ Adjuvans
%TIM-3 ⁺ der CD3 ⁺ CD4 ⁺ :	1,8+/-0,9%	4,5%	3,5+/-1,2%
	(n=6)	(n=1)	(n=4)

Tab. 4.4: TIM-3 Expression bei Arthritis. Am Durchflusszytometer wurde die TIM-3 Expression auf T-Helfer-Zellen der Milz von unbehandelten, gesunden DBA/1 Mäusen, gesunden PBS behandelten Kontrollgruppen und kranken (Krankheitsgrad ≥ 3) Tieren untersucht, bei denen eine Arthritis durch subkutane Immunisierung mit rek. GPI induziert wurde (s. 3.1.3.1). In der Tabelle ist jeweils die Frequenz TIM-3⁺ Zellen der CD3⁺ CD4⁺ T-Helfer-Zellen als Mittelwert mit, soweit möglich, Standardabweichung angegeben. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Proben vermerkt.

Tab. 4.4 zeigt, dass die Frequenz TIM-3 exprimierender Th-Zellen in der Milz erkrankter, mit GPI und Adjuvans immunisierter Tiere mit 3,5+/-1,2% in Bereichen liegt, die vergleichbar sind mit dem bei gesunden, mit PBS und Adjuvans immunisierten Tieren gemessenen Wert von 4,5%. Im Vergleich dazu liegt die TIM-3 Expression auf Th-Zellen in der Milz von gesunden, unbehandelten, also naiven DBA/1 mit 1,8+/-0,9 % unter jenem immunisierter Tiere. Geht man davon aus, dass die Behandlung mit Adjuvans einen Teil der T-Zellen der Mäuse aktiviert, was eine Erhöhung der TIM-3 Expression zur Folge haben könnte, gibt es keine Hinweise dafür, dass in der Milz erkrankter Mäuse mit geschwollenen Gelenken der Anteil TIM-3⁺ Th-Zellen erhöht ist.

4.1.4.2 Systemischer Lupus Erythematosus (SLE)

MRL/lpr Mäuse entwickeln wegen einer Mutation mit zunehmendem Alter eine autoimmune Erkrankung, deren Symptome viele Gemeinsamkeiten mit der humanen Autoimmunkrankheit SLE aufweisen (s.1.6.2). In jungen (ca. 4 Wochen alt) und in alten (3,5 bis 4,5 Monate alt) MRL/lpr Mäusen wurde die TIM-3 Expression auf den Th-Zellen untersucht, um festzustellen, ob das TIM-3 Molekül auf Th-Zellen in kranken und gesunden Tieren unterschiedlich exprimiert wird. Die Milz (ca. 1,5 cm x 0,5 cm x 0,2 cm) und die Lymphknoten der jungen Tiere hatten eine normale Größe. Sie ist vergleichbar mit der in anderen Inzuchtstämmen wie BALB/c oder C57BL/6 Mäusen. Bei den alten Tieren hingegen waren sowohl die Milz als auch sämtliche Lymphknoten stark vergrößert. Die Milz war beispielsweise zweimal größer (ca. 3,5 cm x 0,8 cm x 0,3 cm) und enthielt ungefähr achtmal mehr Zellen als die der jungen Tiere. Bei den alten Tieren wurden auch stark erhöhte Werte für den Proteingehalt im Urin gemessen. In Tab. 4.5 sind die erhaltenen Daten für die Proteinurie, für die Gesamtzahl der Splenozyten und für den prozentualen Anteil TIM-3 exprimierender Zellen der Th-Zellen in der Milz zusammengefasst.

Alter:	1 Monat	3,5 - 4,5 Monate
Proteinurie (mg/dl Urin):	0-300	≥ 300
Gesamtzahl Milzzellen($\times 10^{+6}$):	65,6 +/- 23,2 (n=4)	530 +/- 178,7 (n=4)
%TIM-3 ⁺ von CD3 ⁺ CD4 ⁺ der Milz:	2,4 +/- 1,7 (n=4)	22,9 +/- 6,4 (n=4)

Tab. 4.5: TIM-3 Expression bei SLE. In dieser Tabelle ist die Gesamtzahl der Splenozyten nach Lysis der Erythrozyten und der prozentuale Anteil TIM-3⁺ der CD3⁺ CD4⁺ Zellen in der Milz junger, gesunder und alter, erkrankter MRL/lpr Mäuse als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben.

In älteren MRL/lpr Mäusen ist die Proteinurie und die Gesamtzahl der Splenozyten im Vergleich zu jungen Tieren stark erhöht. Ebenso ist der Anteil von TIM-3⁺ Zellen an den Th-Zellen in älteren Tieren ca. 10fach höher als in jungen. Die erhöhte Frequenz TIM-3 exprimierender Th-Zellen ist daher mit der Akkumulation aktivierter Zellen und dem Ausbruch der Autoimmunerkrankung SLE assoziiert. In diesem murinen SLE-Modell wird also das Ausbrechen der Symptome bei zunehmendem Alter der Mäuse vom Auftreten vermehrt TIM-3 exprimierender Th-Zellen begleitet.

4.1.5 Assoziation der TIM-3 Expression mit Aktivierungsmarkern auf Th-Zellen

Die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle gibt Aufschluss über den Aktivierungszustand einer Th-Zelle (s.1.3). Einige Moleküle wie CD69, CD154, CD44, CD134, CD25 und ICOS werden von aktivierten und kaum bis gar nicht von ruhenden Th-Zellen exprimiert. Die Expression von CD62L wird dagegen nach Aktivierung der Th-Zelle rasch herunterreguliert. Hier sollte untersucht werden, ob Th-Zellen, die TIM-3 exprimieren, sich durch ein Expressionsmuster anderer aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker charakterisieren lassen können. Auf Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen, 9 oder 10 Tage nach Infektion mit 10 Zysten *T.gondii*, wurde durchflusszytometrisch *ex vivo* auf CD4⁺ Zellen die Koexpression von TIM-3 mit CD69, CD44, CD134, CD62L, CD25 oder ICOS untersucht. Ein Teil der Zellen wurde für 30 Minuten mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend die Koexpression von TIM-3 mit CD154 (CD40L) am Durchflusszytometer untersucht, da die Expression von CD154 *ex vivo* zu gering war, um nachgewiesen zu werden. Um festzustellen, ob die Koexpression jeweils koordiniert oder unabhängig voneinander ist, wurde die beobachtete (obs.) mit der erwarteten (exp.) Frequenz der Koproduzenten verglichen und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) berechnet (s. 3.4.4). ϕ -Werte die größer als 0,1 bzw. geringer als -0,1 sind, wurden als signifikant erachtet. Somit wird bei ϕ -Werten zwischen -0,1 und +0,1 eine zufällige Koexpression des jeweiligen Molekülpärchens

angenommen. ϕ -Werte zwischen -1 und $-0,1$ weisen auf eine negativ korrelierte Expression hin, während ϕ -Werte zwischen $+0,1$ und $+1$ auf eine bevorzugte Koexpression deuten. Abb.4.6 zeigt beispielhaft ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 9 untersuchten Tieren.

Zusammenfassend wurde eine stochastisch verteilte Koexpression von TIM-3 mit CD69 mit ϕ -Werten zwischen $-0,1$ und $+0,1$ bei 8 von 9 untersuchten Tieren ermittelt. Bei 7 von 9 untersuchten Tieren wurde eine positive Assoziation der TIM-3 Expression mit der Koexpression von CD25, bei 8 von 9 mit CD44 und bei 5 von 6 mit CD154 gefunden. Bei allen untersuchten Tieren wurde TIM-3 bevorzugt mit ICOS und CD134 koexprimiert, während eine stark negative Korrelation der TIM-3 Expression mit der CD62L Expression vorlag.

Somit weisen Th-Zellen, die TIM-3 exprimieren eher einen aktivierten Phänotyp auf, und sind statistisch wahrscheinlicher $CD25^+$, $CD44^+$, $ICOS^+$, $CD134^+$ und $CD154^+$ und $CD62L^-$. Das bedeutet, TIM-3 wird eher auf Th-Zellen mit einem aktivierten Phänotyp exprimiert.

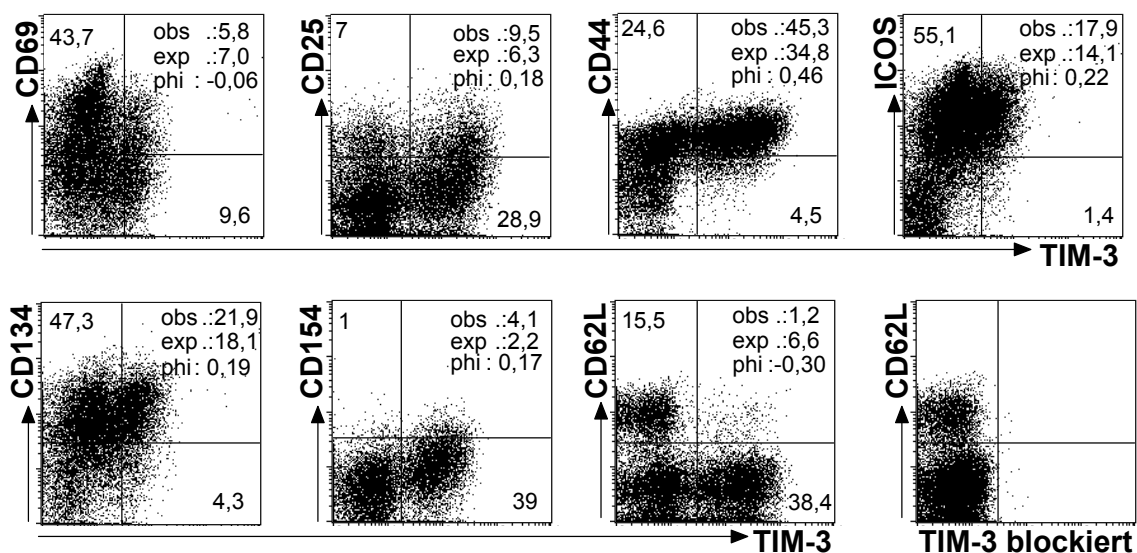


Abb. 4.6: Assoziation der TIM-3 Expression mit aktivierungsinduzierten Oberflächenmolekülen auf Th-Zellen. C57BL/6 Mäuse wurden oral mit 10 Zysten *T. gondii* ME49 infiziert. Neun oder zehn Tage nach der Infektion wurden Splenozyten isoliert und *ex vivo* durchflusszytometrisch die Expression von CD4, TIM-3 und CD69, CD25, CD44, ICOS, CD134 und CD62L gemessen. Ein Aliquot wurde 30 Min. mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend die Expression von CD4, TIM-3 und CD154 gemessen. Nach PI-Exklusion ausgewählte $CD4^+$ Zellen werden in den Dot Plots angezeigt. Die Spezifität der TIM-3 Markierung wurde jeweils durch eine mit einem Überschuss unkonjugiertem anti-TIM-3 blockierte Kontrollfärbung überprüft und wird beispielhaft im unteren rechten Dot Plot gezeigt. Die Frequenz der positiven $CD4^+$ Zellen in Prozent ist jeweils in den Quadranten angegeben. Im oberen rechten Quadranten ist die beobachtete (obs.) Frequenz der koexprimierenden Zellen, die erwartete (exp.) Frequenz, berechnet für zufällige Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen, und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) des jeweiligen Oberflächenmolekülpärchens angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt neun untersuchten Tieren.

4.2 Assoziation der TIM-3 Expression mit einem Th1-Phänotyp

TIM-3 wurde bei der Suche nach differenziell von Th1- und Th2-Zellen exprimierten Genen als ein auf mRNA-Ebene stärker von Th1-Zellen exprimiertes Gen gefunden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Expression von TIM-3 auf der Oberfläche einer Th-Zelle mit einem Th1-Phänotyp in Verbindung gebracht werden kann.

4.2.1 Kinetik der TIM-3 Expression auf Th-Zellen nach *in vitro* Stimulation

Um die Kinetik der TIM-3 Expression auf Th-Zellen zu untersuchen, wurden Th1- und Th2-Linien *in vitro* hergestellt. Hierfür wurden CD4⁺ CD62L⁺ naive Th-Zellen aus Milzen von OVA-T-Zellrezeptor (DO11.10-TZR) transgenen DO11.10 Mäusen mittels MACS-Technologie aufgereinigt und mit syngenen, bestrahlten, ebenfalls mittels MACS T-Zell-depletierten antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und OVA₃₂₃₋₃₃₉ unter Zugabe von IL-12 und anti-IL-4 (Th1) bzw. IL-4 und anti-IL-12 (Th2) *in vitro* kultiviert (s. 3.2.5.2). Die Reinheit der naiven CD4⁺ CD62L⁺ Th-Zellen lag in sämtlichen durchgeführten Versuchen bei mindestens 99% CD4⁺ und mindestens 71% bis über 91% CD62L⁺. Die T-Zell-depletierten APZ waren in allen Versuchen zu mindestens 99% frei von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und wurden zusätzlich bestrahlt (s.3.2.5.2). Drei Tage nach der Primärstimulation wurden die Kulturen expandiert und mit rekombinant hergestelltem IL-2 gefüttert. Eine Woche nach der Primärstimulation wurden tote Zellen über einen Dichtegradienten abgetrennt und die Zellen mit frisch hergestellten APZ und den genannten Zusätzen *in vitro* restimuliert. Auf diese Weise wurden die Th1- und Th2-Linien bis zu 42 Tage kultiviert.

An den in Abb.4.7 angegebenen Zeitpunkten wurden den Kulturen Zellen entnommen und die Expression von CD4, des transgenen DO11.10-TZR und TIM-3 am Durchflusszytometer untersucht, um den Anteil TIM-3 exprimierender Zellen an den TZR-transgenen Th-Zellen zu bestimmen (Abb.4.7 A). Es wurden Färbungen mit einem Kontrollantikörper des passenden Isotyps und/ oder durch einen 100fachen Überschuss unkonjugierten anti-TIM-3 Antikörpers blockierte Färbungen zur Kontrolle der Spezifität mitgeführt. Der Hintergrund der jeweiligen Spezifitätskontrolle lag bei allen Proben unter 1% und wurde jeweils vom Wert für den prozentualen Anteil TIM-3⁺ Zellen der DO11.10-TZR⁺ CD4⁺ abgezogen. Die so erhaltene spezifische Expression ist in Abb. 4.7 A als Mittelwert mit Standardabweichung auf der y-Achse angegeben. An den Restimulationszeitpunkten wurden zusätzliche Zell-Aliquots entnommen und 4 Stunden *in vitro* mit PMA/Ionomycin stimuliert, wobei Brefeldin A zur Sekretionshemmung in den letzten beiden Stunden zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, und die Produktion von IFN- γ und IL-4 wurde über intrazelluläre Durchflusszytometrie analysiert, um die Th1/Th2-Polarisierung zu überprüfen (Abb.4.7 B).

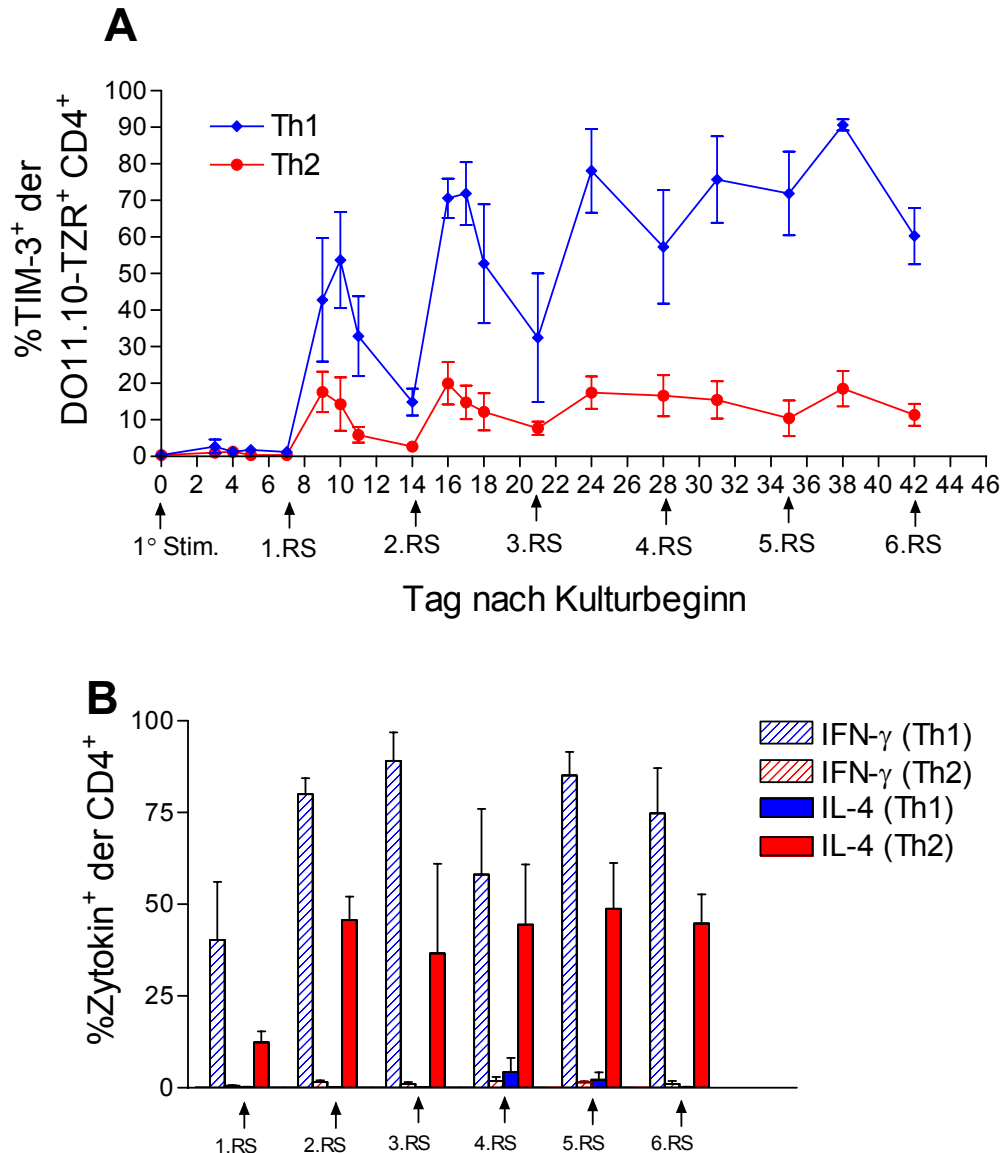


Abb. 4.7: Kinetik der TIM-3 Expression auf Th1- und Th2-Zellen *in vitro*. (A) Kinetik der TIM-3 Expression muriner DO11.10 Th1- und Th2-Zelllinien. Ovalbumin spezifische T-Zell-Rezeptor (DO11.10-TZR) transgene, naive CD4⁺ CD62L⁺ Zellen wurden mittels MACS aus den Milzen von DO11.10 Mäusen aufgereinigt und *in vitro* mit T-Zell-depletierten APZ und OVA₃₂₃₋₃₃₉ unter Th1- (mit rek. IL-12 und anti-IL-4, blaue Linie) oder Th2 (mit rek. IL-4 und anti-IL-12, rote Linie) polarisierenden Bedingungen kultiviert. An den angegebenen Zeitpunkten (Pfeil) wurden tote Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt und die Kulturen mit frisch hergestellten APZ und den erwähnten Zusätzen restimuliert. In Aliquots der Kulturen wurde durchflusszytometrisch die Expression von CD4, DO11.10-TZR und TIM-3 untersucht. Nach PI-Exklusion wurden lebende transgene DO11.10-TZR⁺ CD4⁺ Th-Zellen ausgewählt. Auf der x-Achse sind die Tage nach Primärstimulation sowie die Restimulationszeitpunkte angegeben. Die y-Achse zeigt den Anteil TIM-3 exprimierender Zellen. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus 3 unabhängigen Experimenten. (B) Zu den Restimulationszeitpunkten wurden Zellaliquots *in vitro* 4h unspezifisch mit PMA/Ionomycin restimuliert und durchflusszytometrisch die intrazelluläre IFN-γ und IL-4 Produktion analysiert, um die erfolgreiche Polarisierung der T-Zell-Linien zu überprüfen. Dargestellt ist der Anteil IFN-γ (schraffierte Balken) und IL-4 (ausgefüllte Balken) Produzenten an den auf der x-Achse genannten Zeitpunkten für Th1- (blau) und Th2- (rot) T-Zell-Linien. Gezeigt werden die gemittelten Werte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Th1-Zellen besitzen einen hohen Anteil IFN- γ Produzenten und kaum IL-4 Produzenten (Abb.4.7 B). Bei den Th2-Linien verhält es sich umgekehrt, sie enthalten viele IL-4 Produzenten und einen sehr geringen Anteil IFN- γ Produzenten. Aus diesem Grund kann von einer erfolgreichen Polarisierung der Zellen ausgegangen werden.

Vor der Stimulation mit Antigen exprimiert nur ein sehr geringer Anteil der Th-Zellen (0,4%) TIM-3 (Abb.4.7 A). Diese Expression ist wahrscheinlich auf eine sehr geringfügige und mit der Methode nicht zu vermeidende Kontamination mit CD4⁺ CD62L⁻ Th-Zellen zurückzuführen. Während der ersten Kulturwoche bleibt die TIM-3 Expression sowohl für Th1- als auch für Th2-Zellen auf diesem niedrigen Niveau. Zwei bis drei Tage nach der ersten Restimulation, also dem zweiten Antigenkontakt, erhöht sich jedoch der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen in den Th1-Kulturen auf über 50% und fällt dann wieder auf ca. 15% unmittelbar vor der zweiten Restimulation ab. Dieses Ergebnis weist auf eine aktivierungsabhängige TIM-3 Expression. Dies gilt sowohl für Th1- als auch für Th2-Zellen, der Anteil TIM-3 exprimierender Zellen ist jedoch in den Th1-Linien höher. Nach zwei Stimulationsrunden sind ca. 70% der Th1-Zellen TIM-3⁺ (Tag16/17), während der maximale Anteil in den Th2-Linien bei 20% liegt. Der Unterschied zwischen Th1- und Th2-Linien wird mit fortschreitender Dauer der Kultur, also nach weiteren Ag-Kontakten, stärker und deutlicher. Ebenso verringert sich der Unterschied zwischen Minimum und Maximum des Anteils TIM-3 exprimierender Zellen in den Kulturen. Diese Stabilisierung des TIM-3 Expressionsmusters führt nach einigen Wochen zu einer dominierenden TIM-3⁺ Population in Th1-Kulturen von 60-90% und einer viel kleineren Population von 10-20% in Th2-Linien.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass TIM-3 bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich, von etablierten Th1-Zellen *in vitro* exprimiert wird. In Th2-Kulturen exprimiert jedoch auch ein kleiner Anteil der Zellen TIM-3. Darüber hinaus ist die Expression von TIM-3 abhängig von Aktivierung.

4.2.2 Zytokinexpression von TIM-3⁺ Th-Zellen

Das bislang wichtigste Merkmal zur Unterscheidung von Th1- und Th2-Zellen ist ihre Fähigkeit, Zytokine zu produzieren. Während Th1-Zellen hauptsächlich proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- β produzieren, zeichnen sich Th2-Zellen durch die Synthese von IL-4, IL-5 und IL-13 aus. Th1-Zellen exprimieren kein IL-4 und Th2-Zellen kein IFN- γ . In älteren Arbeiten wurde IL-2 zu den Th1-Zytokinen und IL-10 zu den Th2-Zytokinen gezählt. Mittlerweile ist jedoch klar, dass sich die Expression dieser beiden Zytokine nicht auf die erwähnten Populationen beschränkt. TNF- α kann von Th1- und Th2-Zellen gebildet werden, ebenso wie IL-10, welches zusätzlich von Th-Zellen mit regulatorischen Funktionen produziert wird (s. 1.4.1). Ebenso kann IL-17 weder den Th1- noch den Th2-Zytokinen zugeordnet werden und wird meist gemeinsam mit den proinflammatorischen Zytokinen

TNF- α und GM-CSF hergestellt. Die Expression von IL-17 kann in Th-Zellen in der Maus und beim Menschen durch mikrobielle Stimuli induziert werden (Infante-Duarte et al., 2000). Th0-Zellen sind in der Lage, gleichzeitig sowohl Th1-Zellen zugeordnete als auch für Th2-Zellen charakteristische Zytokine herzustellen.

Diese Th-Subpopulationen werden demnach über das Muster der Zytokine, die von ihnen exprimiert werden, charakterisiert. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die TIM-3 Expression auf Th-Zellen mit einem bestimmten Muster produzierter Zytokine assoziiert ist und daraufhin einer bestimmten Th-Subpopulation zugeordnet werden kann. Hierfür wurde erstmals auf Einzelzellebene simultan die Expression von TIM-3 auf der Zelloberfläche und die intrazelluläre Zytokinproduktion durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.2.1 Zytokinexpression von TIM-3⁺ Th-Zellen *in vitro*

Zunächst wurde in *in vitro* generierten Th0-Zellen, die sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine produzieren, nach einer Assoziation der TIM-3 Expression mit einem bestimmten Zytokinproduktionsmuster gesucht.

Die Th0-Linien wurden aus CD4 angereicherten Splenozyten mittels Stimulation mit plattengebundenen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern wie unter 3.2.5.2 beschrieben hergestellt. Nach drei oder vier Wochen in Kultur waren die Zellen zu über 99% CD4⁺ und wurden nach Abtrennung abgestorbener Zellen für 4 Stunden mit PMA/ Ionomycin restimuliert. Brefeldin A wurde nach 2 Stunden hinzugefügt, um die Sekretion der produzierten Zytokine zu verhindern, damit sie anschliessend über intrazelluläre Durchflusszytometrie detektiert werden konnten. Auf diese Weise konnte die Oberflächenexpression von TIM-3 gegen die intrazelluläre Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-17 auf Th0-Zellen untersucht werden. Um festzustellen, ob die Koexpression jeweils koordiniert oder unabhängig voneinander ist, wurde die beobachtete (obs.) mit der erwarteten (exp.) Frequenz der Koproduzenten verglichen und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) vergleichbar zu dem unter 4.1.5 beschriebenen Versuch berechnet (s. 3.4.4). Wiederum wurde bei ϕ -Werten zwischen -0,1 und +0,1 eine zufällige Koexpression des jeweiligen Molekülpärchens angenommen. ϕ -Werte zwischen -1 und -0,1 weisen auf eine negativ assoziierte Expression, während ϕ -Werte zwischen +0,1 und +1 auf bevorzugte Koexpression deuten.

Abb. 4.8 zeigt ein repräsentatives Beispiel für Th0-Zellen an Tag 21.

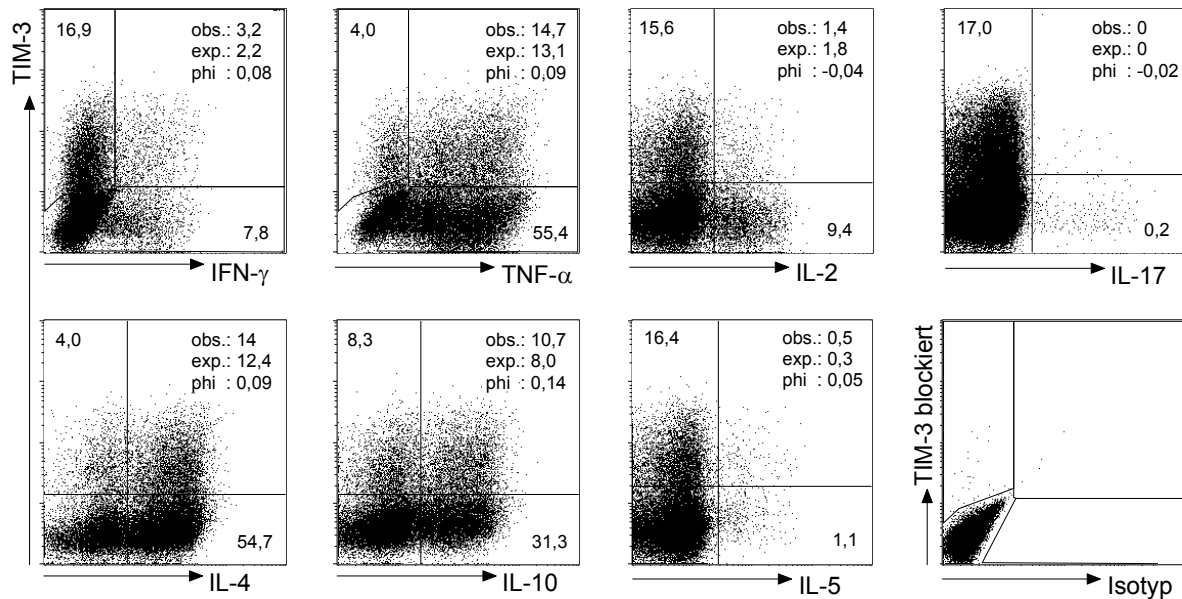


Abb. 4.8: Koexpression von TIM-3 und Zytokinen in Th0-Zellen *in vitro*. 21 Tage alte *in vitro* hergestellte Th0-Zellen wurden für Oberflächen-TIM-3 Expression gefärbt und 4h unspezifisch mit PMA/Ionomycin stimuliert. Brefeldin A wurde während der letzten 2h der Stimulation zugesetzt, um die Zytokinsekretion zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt für intrazelluläres IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17, IL-4, IL-10 und IL-5 und durchflusszytometrisch untersucht. Die Spezifität der Färbungen wurde mittels Isotypkontrollen oder Blockieren mit unkonjugiertem Antikörper überprüft. Die Frequenz der positiven Zellen in Prozent ist jeweils in den Quadranten angegeben. Im oberen rechten Quadranten ist die beobachtete (obs.) und die erwartete (exp.) Frequenz der koexprimierenden Zellen, berechnet für zufällige Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen, und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

In Abb.4.8 ist zu sehen, dass TIM-3 exprimierende Th-Kulturzellen in der Lage sind, IFN- γ , IL-2 und TNF- α , aber auch IL-4, IL-5 und IL-10 zu produzieren. Der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) liegt für TIM-3 und alle gemessenen Zytokine bis auf IL-10 zwischen $-0,1$ und $+0,1$, d.h., dass bei Th0-Zellen eine stochastische Koexpression von TIM-3 und den gemessenen Zytokinen beobachtet wurde. Für die Koexpression von TIM-3 und IL-10 in Th0-Zellen wurde mit ϕ -Werten von $0,1-0,15$ eine positive Korrelation ermittelt.

Zusammenfassend sind Th-Zellen, die TIM-3 exprimieren, in der Lage, die für Th2-Zellen charakteristischen Zytokine IL-4 und IL-5 zu produzieren. Außerdem war die Frequenz der IL-4 bzw. IL-5 produzierenden und gleichzeitig TIM-3 exprimierenden Th-Zellen in allen Versuchen so hoch, wie bei zufälliger Verteilung erwartet worden wäre. Die TIM-3⁺ Th-Zellen zeigten also keine Tendenz zu einer verminderten Expression dieser Zytokine. Es konnte jedoch auch keine bevorzugte Expression des für Th1-Zellen charakteristischen Zytokins IFN- γ durch TIM-3⁺ Th-Zellen festgestellt werden. Somit wird TIM-3 nicht ausschließlich und spezifisch von Th1-Zellen exprimiert und wird unter diesen Kulturbedingungen auch nicht bevorzugt mit Th1-Zytokinen koexprimiert.

4.2.2.2 Zytokinexpression von TIM-3⁺ Th-Zellen *ex vivo* nach Infektion

Nach der Untersuchung der Korrelation der TIM-3 Expression mit der Zytokinproduktion auf Th0-Zellen, die *in vitro* generiert wurden, erfolgte nun die Untersuchung auf *in vivo* differenzierten Th-Zellen in dem bereits beschriebenen Infektionsmodell mit *T. gondii*.

Nichtinfizierten und infizierten (6,9 und 14 Tage nach einer Infektion mit *T. gondii*) C57BL/6 Mäusen wurden die Milzen entnommen. Die Zellen wurden 6h mit einem *T. gondii*-Lysat (TLA) stimuliert. Brefeldin A wurde nach 2 Stunden hinzugefügt, um die Zytokinsekretion zu verhindern, damit die von gegen *T. gondii* Antigene spezifischen Th-Zellen sezernierten Zytokine anschließend über intrazelluläre Durchflusszytometrie detektiert werden konnten. Auf diese Weise konnte die Oberflächenexpression von TIM-3 simultan mit der intrazellulären Zytokinproduktion auf CD4⁺ Th-Zellen untersucht werden. Bei der Analyse wurden CD4⁺ Lymphozyten ausgewählt und mit Hilfe von Isotypkontrollen und Blockkontrollen die Quadrantenfenster gesetzt. Die beobachtete (obs.) Frequenz der Koproduzenten wurde mit der erwarteten (exp.) verglichen und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) berechnet (s. 3.4.4), um festzustellen, ob die Koexpression von TIM-3 und dem jeweiligen Zytokin koordiniert oder stochastisch ist. Wie zuvor wurden ϕ -Werte kleiner als -0,1 bzw. größer als +0,1 als signifikant angenommen.

Die stärkste TIM-3 Expression wurde 9 Tage nach einer Infektion mit *T. gondii* beobachtet, wie schon in Abb. 4.3 gezeigt wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch das Maximum der Zytokinantwort auf eine Stimulation mit TLA gemessen. Diese wird von IL-2, TNF- α und dem Th1-Zytokin IFN- γ bestimmt. Andere Zytokine wie IL-10 und IL-4 waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in keinem der aufgeführten Gewebe detektierbar (Daten nicht gezeigt). Abb. 4.9 zeigt, dass nur ein Teil der TIM-3 exprimierenden Th-Zellen IFN- γ , IL-2 und TNF- α als Antwort auf die spezifische Stimulation mit Lysat aus *T. gondii* (TLA) produziert und somit auch Effektorfunktionen zum betrachteten Zeitpunkt hat. 14 Tage nach der Infektion ist die Frequenz der TLA-spezifischen Zytokinproduzenten wieder stark abgesunken. So ist beispielsweise die Frequenz der TLA-spezifischen IFN- γ Produzenten von 25% an Tag 9 auf ca. 3% an Tag 14 um das achtfache gesunken, die der IL-2 Produzenten um das vierfache und die der TNF- α Produzenten um das fünffache. Die Frequenz TIM-3 exprimierender Th-Zellen ist dagegen an Tag 14 noch ungefähr halb so hoch wie an Tag 9. Wie in Abb. 4.3 A bereits gezeigt wurde, ist die Frequenz TIM-3⁺ Th-Zellen auch 30 Tage nach der Infektion höher als bei nichtinfizierten Kontrollen aber geringer als an Tag 14. Die Expression von TIM-3 auf Th-Zellen und der Anteil der Th-Zellen, die auf eine spezifische Stimulation hin Zytokine produzieren, verlaufen nach einer Infektion mit *T. gondii* mit einer vergleichbaren Kinetik mit maximalen Frequenzen an Tag 9. Der Anteil der TLA-spezifischen Zytokinproduzenten erniedrigt sich von Tag 9 bis Tag 14 jedoch mehr als die Frequenz der TIM-3⁺ Th-Zellen.

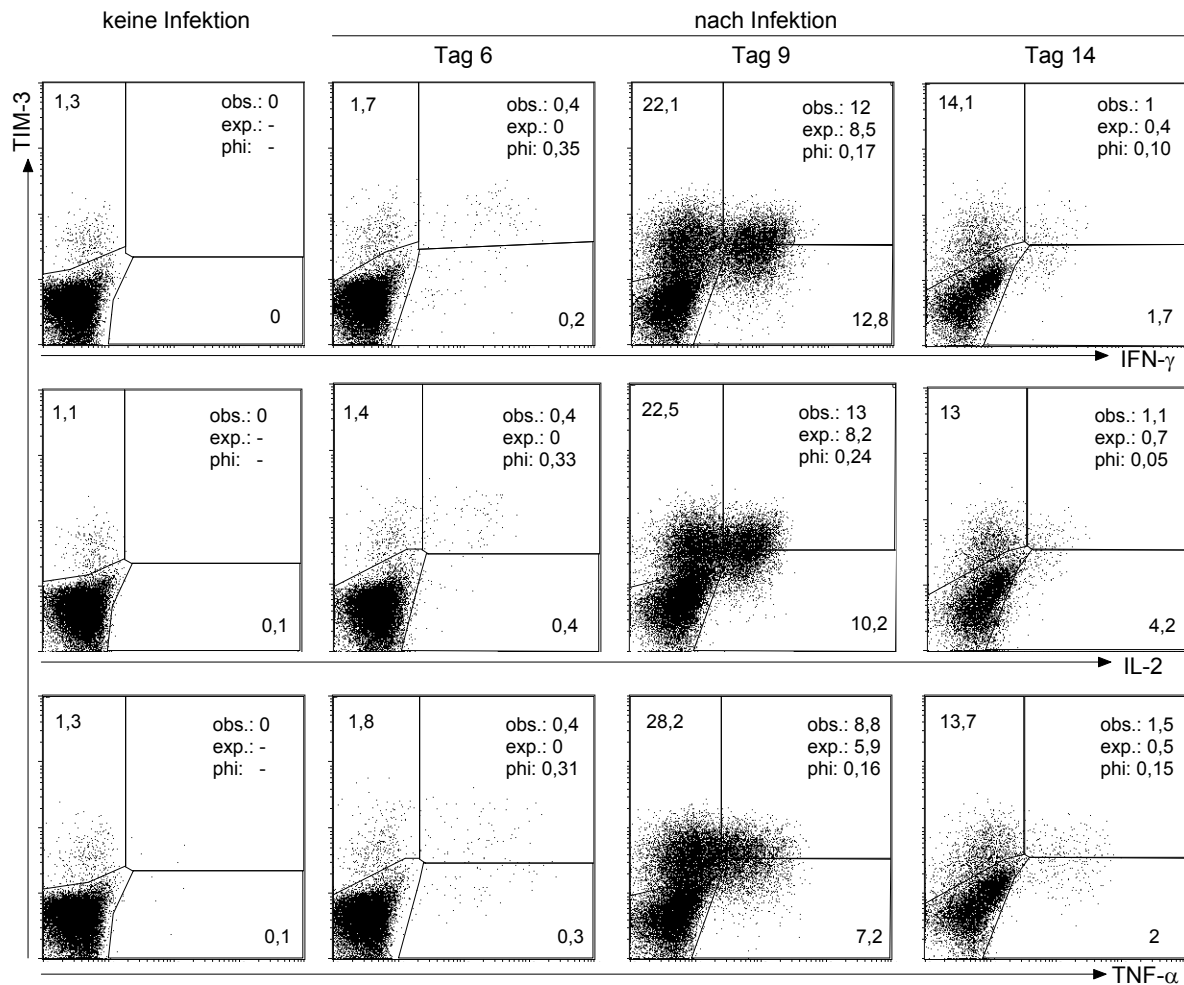


Abb. 4.9: Kinetik der Koexpression von TIM-3 und Effektorzytokinen nach Infektion mit *T. gondii*. Vor und nach einer Infektion mit *T. gondii* wurden Lymphozyten aus der Milz von C57BL/6 Mäusen für Oberflächen-TIM-3 Expression gefärbt und 6h spezifisch mit *T. gondii*-Lysat stimuliert. Brefeldin A wurde während der letzten 2h der Stimulation zugesetzt, um die Zytokinsekretion zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt für intrazelluläres IFN-γ, IL-2, TNF-α und durchflusszytometrisch untersucht. Die Spezifität der Färbungen wurde mittels Isotypkontrollen oder Blockieren mit unkonjugiertem Antikörper überprüft. Die Frequenz der positiven Zellen in Prozent ist jeweils in den Quadranten angegeben. Im oberen rechten Quadranten ist die beobachtete (obs.) und die erwartete (exp.) Frequenz der koexprimierenden Zellen, berechnet für zufällige Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen, und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) angegeben. Gezeigt sind repräsentative Daten für jeweils eines von drei untersuchten Tieren.

An Tag 9 nach Infektion, also zum Zeitpunkt der maximalen Immunantwort, wurde die TIM-3 Expression und die TLA-spezifische Zytokinproduktion in verschiedenen Organen bestimmt. Zellen wurden aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten (mLN), der Leber und dem Dünndarm (DD-IEL und DD-LPL) infizierter Mäuse isoliert. Die Zellen wurden, wie eben beschrieben, stimuliert und analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 4.10 dargestellt. Im Unterschied zu den in Abb. 4.3 C gezeigten Daten, bei denen die Zellen mit PMA/ Ionomycin stimuliert wurden, sind die in Abb. 4.10 gezeigten Frequenzen der

gemessenen IFN- γ Produzenten sehr viel niedriger. Dabei ist zu beachten, dass, wie unter 3.4.3.1 bereits erklärt wurde, durch PMA/Ionomycin unspezifisch alle Zellen zur Produktion der Zytokine angeregt werden, zu deren Expression sie zu diesem Zeitpunkt in der Lage sind. Dagegen werden durch TLA nur solche Zellen stimuliert, die zu diesem Zeitpunkt spezifisch im TLA vorhandene Antigene erkennen. Die Unterschiede in den Anteilen der IFN- γ Produzenten sind deshalb auf die unterschiedlichen Stimulationen zurückzuführen.

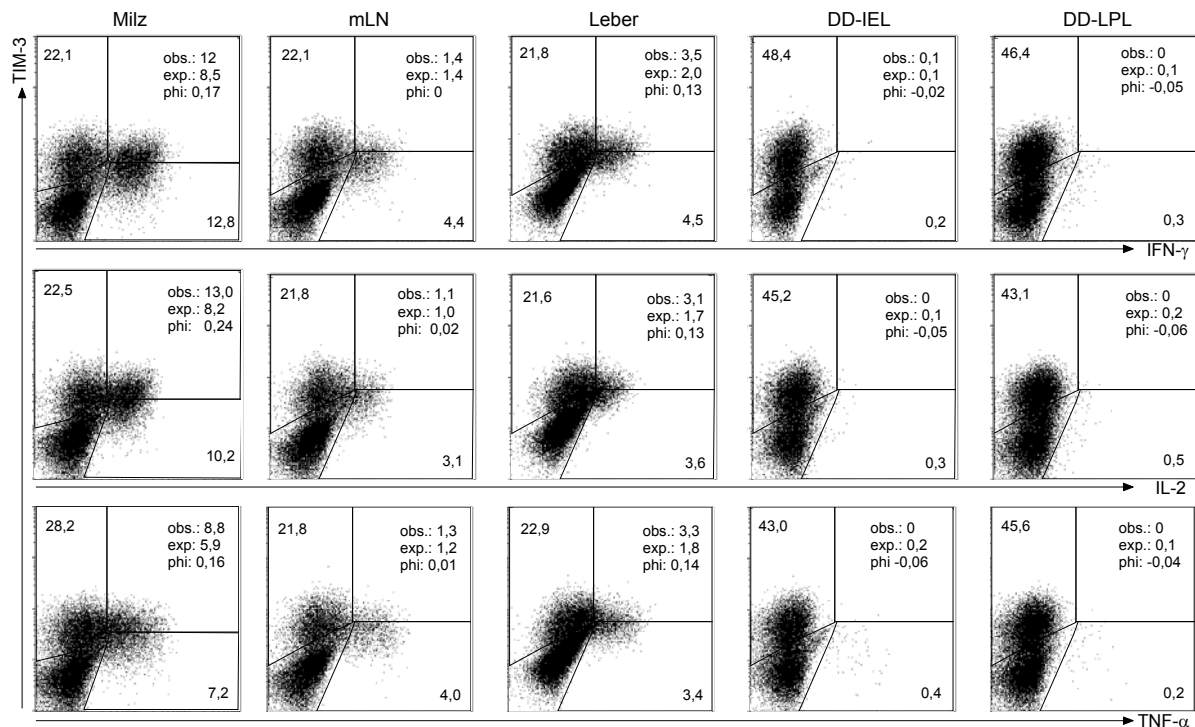


Abb. 4.10: Koexpression von TIM-3 und Effektorzytokinen in verschiedenen Organen nach Infektion mit *T. gondii*. 9 Tage nach einer Infektion mit *T. gondii* wurden Lymphozyten aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten (mLN), der Leber und dem Dünndarm (DD-IEL und DD-LPL) von C57BL/6 Mäusen isoliert, für Oberflächen-TIM-3 Expression gefärbt und 6h spezifisch mit *T. gondii*-Lysat stimuliert. Brefeldin A wurde während der letzten 2h der Stimulation zugesetzt, um die Zytokinsekretion zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt für intrazelluläres IFN- γ , IL-2, TNF- α und durchflusszytometrisch untersucht. Die Spezifität der Färbungen wurde mittels Isotypkontrollen oder Blockieren mit unkonjugiertem Antikörper überprüft und mithilfe dieser Kontrollfärbungen wurden jeweils die Auswahlfenster für die Analyse gesetzt. Die Frequenz der positiven Zellen in Prozent ist jeweils in den Quadranten angegeben. Im oberen rechten Quadranten ist die beobachtete (obs.) und die erwartete (exp.) Frequenz der koexprimierenden Zellen, berechnet für zufällige Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen, und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

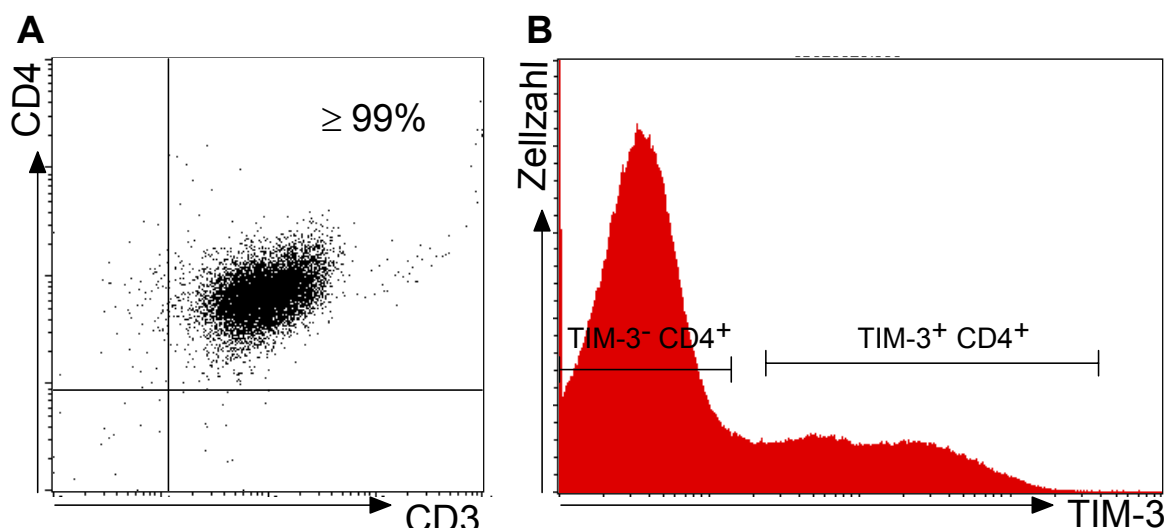
Abb. 4.10 zeigt, dass in allen untersuchten Organen neun Tage nach der oralen Infektion mit *T. gondii* ein stark erhöhter Anteil TIM-3 exprimierender Th-Zellen vorliegt, aber nur in der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und der Leber ist auch ein deutlicher Anteil TLA-spezifischer Zytokinproduzenten detektierbar. Dabei haben die Th-Zellen in der Milz den höchsten Anteil. Bei den DD-IEL und den DD-LPL wurden mit weniger als 1% der CD4⁺ Th-

Zellen sehr geringe bis gar keine Frequenzen TLA-spezifischer IFN- γ bzw. IL-2 oder TNF- α Produzenten ermittelt (Abb. 4.10). Das traf auch auf Tag 6 und Tag 14 nach der Infektion zu (Daten nicht gezeigt). Dennoch exprimieren an Tag 9 40-50% dieser Th-Zellen das TIM-3 Molekül. Die orale Infektion mit dem Protozoon *T. gondii* führt also unter den IEL und LPL des Dünndarms zu einem erhöhten Anteil TIM-3 exprimierender Th-Zellen, ohne dass diese Zellen zum gemessenen Zeitpunkt nach einer Restimulation mit TLA Effektorzytokine produzieren. Dagegen befinden sich unter den TIM-3 exprimierenden Th-Zellen in der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und der Leber TLA-spezifische Effektorzellen, die inflammatorische Zytokine sezernieren. Zum gemessenen Zeitpunkt produzieren nicht alle TIM-3⁺ Th-Zellen Zytokine und nicht alle Zytokin-produzierenden Th-Zellen exprimieren TIM-3, aber ein höherer Anteil, als bei zufälliger Verteilung zu erwarten wäre, koexprimiert TIM-3 und IFN- γ bzw. IL-2 oder TNF- α in der Milz und in der Leber (Abb. 4.10). Das macht der Vergleich der beobachteten (obs.) und der erwarteten (exp.) Frequenz der Koproduzenten mittels des ϕ -Korrelationskoeffizienten (ϕ) deutlich, der für diese Organe deutlich höher als 0,1 ist und deshalb auf eine positive Korrelation der Koexpression hinweist. Bei den mLN liegt der ϕ -Korrelationskoeffizient bei 0 und zeigt an, dass die Expression von TIM-3 und den gemessenen Zytokinen in diesem Gewebe zufällig verteilt ist. Die Expression von TIM-3 auf Th-Zellen impliziert also nicht, dass diese Zellen auch Effektorzytokine sezernieren. Es liegt jedoch eine bevorzugte Assoziation zwischen der Expression von TIM-3 und der Produktion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α bei Th-Zellen aus der Milz und der Leber von Mäusen nach einer Infektion mit *T. gondii* vor.

4.2.2.3 Zytokinexpression von TIM-3⁺ Th-Zellen ex vivo in MRL/lpr Mäusen

Bei älteren, erkrankten MRL/lpr Mäusen liegt eine hohe Frequenz von Th-Zellen vor, die gleichzeitig IFN- γ und IL-10 exprimieren (Doppelproduzenten). Die Assoziation von der TIM-3 Expression mit der Koproduktion einer Kombination von Zytokinen wurde deshalb ex vivo in diesem Mausmodell einer spontanen Autoimmunkrankheit untersucht. Aus Splenozyten von vier Monate alten und erkrankten MRL/lpr Mäusen mit mindestens 300 bis über 2000 mg Protein/dl Urin wurden mittels MACS CD4⁺ Zellen auf Reinheiten von mindestens 96% CD3⁺ CD4⁺ angereichert (s. Abb. 4.11 A). Die Zellen wurden für die Oberflächenexpression von TIM-3 markiert und für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin (die letzten 2 Stunden unter Zusatz von Brefeldin A) stimuliert. Anschließend erfolgte die simultane intrazelluläre Färbung von IL-10, IFN- γ und TNF- α und die Untersuchung am Durchflusszytometer. Diese Zytokine werden von den Th-Zellen der MRL/lpr Mäuse im Vergleich zu normalen, gesunden Mausstämmen in erhöhter Menge produziert, während Zytokine wie IL-2 und IL-4 gar nicht oder nur stark verringert exprimiert werden (Theofilopoulos and Lawson, 1999). Bei der nachfolgenden Analyse wurde, wie in Abb. 4.11 B demonstriert, durch Setzen von Auswahlbereichen die

Zytokinproduktion der Gesamt CD4⁺ Zellen, der TIM-3⁺ CD4⁺ Zellen sowie der TIM-3⁻ CD4⁺ Zellen untersucht. Für jede mögliche Kombination der gemessenen Zytokine konnte aufgrund der Simultanfärbung die beobachtete (obs.) Frequenz der Koproduzenten mit der erwarteten (exp.) verglichen und der ϕ -Korrelationskoeffizient berechnet werden (s. 3.4.4), um festzustellen, ob die Koexpression des jeweiligen Zytokinpärchens koordiniert oder stochastisch war. Wiederum wurden ϕ -Werte kleiner als $-0,1$ bzw. größer als $+0,1$ als signifikant angenommen. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 4.11 C dargestellt.



Zell- Population	ϕ obs./exp.	IFN- γ	IL-10
Gesamt-CD4 ⁺ :	IL-10	0,18 10,0/ 7,5	-
	TNF- α	0,46 31,9/ 20,7	0,13 6,1/ 4,1
TIM-3 ⁻ CD4 ⁺ :	IL-10	0,17 8,3/ 6,0	-
	TNF- α	0,49 33,5/ 21,5	0,11 5,2/ 3,7
TIM-3 ⁺ CD4 ⁺ :	IL-10	0,18 15,2/ 12,8	-
	TNF- α	0,44 25,6/ 16,0	0,27 8,6/ 4,2

%TIM-3⁺ der Gesamt CD4⁺: 23%
 %IL-10⁺ der Gesamt CD4⁺: 11%
 %IFN- γ ⁺ der Gesamt CD4⁺: 53 %
 %TNF- α ⁺ der Gesamt CD4⁺: 39%

Abb. 4.11: Assoziation von TIM-3 Expression und Zytokinkoproduktion. CD4⁺ Milzzellen wurden mittels MACS aus 3,5-4,5 Monate alten MRL/lpr Mäusen aufgereinigt (A). Die Proteinurie der Tiere betrug mind. 300 mg/dl. Die CD4⁺ Zellen wurden auf ihre TIM-3 Expression gefärbt und mit PMA/Ionomycin für 4h stimuliert und fixiert. Nach intrazellulärer Färbung wurden die Zellen am Durchflusszytometer untersucht. Bei der anschließenden Analyse wurden die Frequenzen Zytokin koexprimierender Zellen der Gesamt-CD4⁺ Zellen, der TIM-3⁻ CD4⁺ und der TIM-3⁺ CD4⁺ Zellen durch Setzen von Auswahlfenstern (B) bestimmt und sind in (C) zusammengefasst. Die beobachteten (obs.) und erwarteten (exp.) Frequenzen Zytokin koexprimierender Zellen sind in Prozent angegeben. Der ϕ -Korrelationskoeffizient (fettgedruckt, von -1 bis 1) wurde berechnet. Gezeigt ist ein repräsentatives von 4 unabhängigen Experimenten. ϕ stimmt für alle Zytokin kombinationen bis auf TNF- α IL-10 Doppelproduzenten in allen 4 Versuchen überein.

In allen vier durchgeführten Versuchen stimmt der ϕ -Koeffizient für alle betrachteten Zytokinkombinationen bis auf die TNF- α IL-10 Doppelproduzenten überein. Bei den TNF- α IL-10 Doppelproduzenten schwankt der ϕ -Wert bei den Gesamt-CD4⁺ Zellen von -0,19 bis 0,13, bei den TIM-3⁻ CD4⁺ Zellen von -0,18 bis 0,11 und bei den TIM-3⁺ CD4⁺ Zellen von -0,02 bis 0,27. Für die Th-Zellen, die TNF- α und IL-10 koexprimieren, schwankt der berechnete ϕ -Wert also zwischen signifikant negativ assoziiert und signifikant positiv assoziiert.

Eine Erklärung dafür wäre, dass bei den Th-Zellen in den durchgeführten Versuchen unterschiedliche Frequenzen von TNF- α IL-10 Doppelproduzenten und von TIM-3⁺ Zellen gemessen wurden, obwohl die untersuchten Tiere jeweils gleichen Alters und gleichen Geschlechts waren und vergleichbare Proteinurie-Werte gemessen wurden. In zwei von vier durchgeführten Versuchen waren 1 bis 3% der Zellen TNF- α IL-10 Doppelproduzenten und 10 bis 13% TIM-3⁺ Zellen und es wurden mittlere bis negative ϕ -Werte gemessen, während in den anderen beiden Versuchen ungefähr 6% TNF- α IL-10 Doppelproduzenten und 17 bis 23% TIM-3⁺ Zellen waren und mittlere bis positive ϕ -Werte gefunden wurden. Über IL-10 und TNF- α koexprimierende Th-Zellen kann deshalb keine endgültige Aussage getroffen werden. Es scheint jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Anteil TNF- α IL-10 Doppelproduzenten und dem Anteil TIM-3⁺ Zellen zu existieren. Bei einem Anteil von TIM-3⁺ Zellen um 10% liegen geringe Frequenzen von weniger als 3% TNF- α IL-10 Doppelproduzenten vor. Die ϕ -Werte sind dann für die Gesamt-CD4⁺ Zellen sowie für TIM-3⁻ CD4⁺ Zellen kleiner als -0,1, und für TIM-3⁺ CD4⁺ Zellen liegt ϕ zwischen -0,1 und +0,1. Bei doppelt so hohen Frequenzen von TIM-3⁺ Zellen ist auch der Anteil TNF- α IL-10 Doppelproduzenten um das Zweifache erhöht. Also produzieren mehr Th-Zellen gleichzeitig TNF- α und IL-10, wenn der Anteil TIM-3⁺ Zellen an den Th-Zellen höher ist. Bei diesen Versuchen mit höheren Frequenzen von TIM-3⁺ Zellen ist ϕ bei den TIM-3⁺ CD4⁺ Zellen wie im in Abb. 4.11 C gezeigten Beispiel deutlich positiver ($\phi = 0,27$) als bei den Gesamt-CD4⁺ ($\phi = 0,13$) sowie den TIM-3⁻ CD4⁺ Zellen ($\phi = 0,11$). Somit wurde eine Tendenz für die Anreicherung der Th-Zellen, die gleichzeitig TNF- α und IL-10 produzieren, in der TIM-3⁺ CD4⁺ Fraktion beobachtet.

Weitere betrachtete Kombinationsmöglichkeiten der Zytokin-Doppelproduzenten sind die Th-Zellen, die gleichzeitig IFN- γ und IL-10 bzw. IFN- γ und TNF- α exprimieren. IFN- γ ist in allen durchgeführten Versuchen mit IL-10 und TNF- α in den Gesamt-CD4⁺ Zellen positiv assoziiert, was durch ϕ -Werte, die deutlich über 0,1 liegen erkennbar ist. Diese Assoziation wurde in beiden Subpopulationen, den TIM-3⁺ und den TIM-3⁻ in allen durchgeführten Versuchen beobachtet. Für diese Zytokin-Doppelproduzenten, nämlich die Th-Zellen, die simultan IFN- γ und IL-10 bzw. IFN- γ und TNF- α exprimieren, konnte demnach keine

Tendenz für eine bevorzugte An- oder Abreicherung in der TIM-3⁺ CD4⁺ Fraktion gemessen werden.

4.2.3 Assoziation der TIM-3 Expression mit einem Th2-Marker

T1/ST2 ist ein funktionell bedeutsames Molekül von Th2-Zellen und wird nicht von Th1-Zellen exprimiert (Löhning et al., 1998; Xu et al., 1998a). Die Expression von TIM-3 wurde im Zusammenhang mit einem Th1-Phänotyp vermutet. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Expression von TIM-3 die Koexpression von T1/ST2 ausschließt. Da T1/ST2 auf Th2-Zellen exprimiert wird, wurde in einem Th2-Infektionsmodell (*N. brasiliensis*) in einem Zielorgan der Infektion, der Lunge, die Koexpression von TIM-3 und T1/ST2 auf Th-Zellen *ex vivo* durchflusszytometrisch untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 4.12 zusammengestellt.

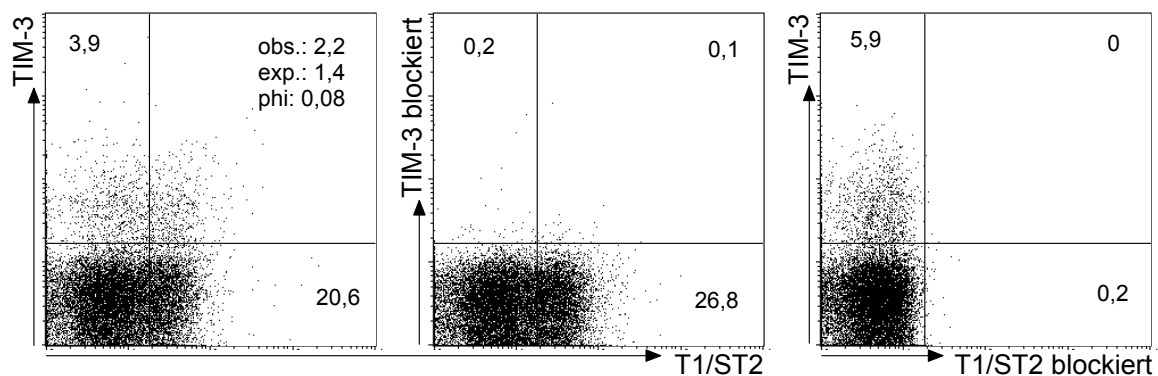


Abb. 4.12: Koexpression von TIM-3 und T1/ST2. 14 Tage nach Infektion mit *N. brasiliensis* wurden Lymphozyten aus der Lunge von BALB/c Mäusen isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD4, TIM-3 und T1/ST2 untersucht. Lymphozyten wurden nach PI-Exklusion toter Zellen anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung ausgewählt, dann wurden die CD4⁺ Zellen ausgewählt und in den Dot Plots dargestellt. Der Anteil TIM-3⁺, T1/ST2⁺, und TIM-3⁺ T1/ST2⁺ Zellen der CD4⁺ Th-Zellen ist in den Quadranten in Prozent angegeben. Im oberen rechten Quadranten ist die beobachtete (obs.) und die erwartete (exp.) Frequenz der TIM-3⁺ T1/ST2⁺ koexprimierenden Zellen, berechnet für zufällige Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen, und der ϕ -Korrelationskoeffizient (phi) angegeben. Zusätzlich sind zwei Spezifitätskontrollen abgebildet, bei denen die Färbung mit TIM-3 bzw. T1/ST2 jeweils mit einem Überschuss unkonjugierten Antikörpers blockiert wurde.

Man sieht, dass die Expression von TIM-3 die Expression von T1/ST2 nicht ausschließt (Abb. 4.12). 14 Tage nach einer Infektion mit *N. brasiliensis* koexprimieren von 6% TIM-3⁺ CD4⁺ Zellen in der Lunge 2% das Th2-Molekül T1/ST2. 20% der CD4⁺ Zellen sind T1/ST2⁺ TIM-3⁻. Der Korrelationskoeffizient für TIM-3 und T1/ST2 Koexpression beträgt 0,08 und liegt somit zwischen -0,1 und +0,1. ϕ deutet deshalb nicht auf negative Korrelation sondern auf zufällige Koexpression hin. In der Milz ist sowohl die TIM-3 (2%) als auch die T1/ST2 (1%) Expression viel niedriger als in der Lunge; dementsprechend findet man dort auch nur 0,1%

Koproduzenten (Daten nicht gezeigt). TIM-3 kann somit auch von T1/ST2⁺ *bona fide* Th2-Zellen exprimiert werden.

4.2.4 Expression von TIM-3 in IFN- γ defizienten Mäusen

IFN- γ ist das charakteristische Effektorzytokin bei Th1-Antworten. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Anwesenheit von IFN- γ auf die TIM-3 Expression untersucht. Die TIM-3 Expression in Mäusen, die defizient für das Th1-Zytokin IFN- γ sind, wurde mit der in wildtyp Mäusen verglichen. Der Phänotyp der IFN- γ ^{-/-} Mäuse wurde durch vierstündige Restimulation mit PMA/Ionomycin und anschließende intrazelluläre Durchflusszytometrie überprüft. Bei IFN- γ ^{-/-} Mäusen waren keine IFN- γ Produzenten detektierbar, während bei wildtyp BALB/c Mäusen, eine geringe, aber detektierbare Anzahl der Th-Zellen IFN- γ produzierte (Abb. 4.13).

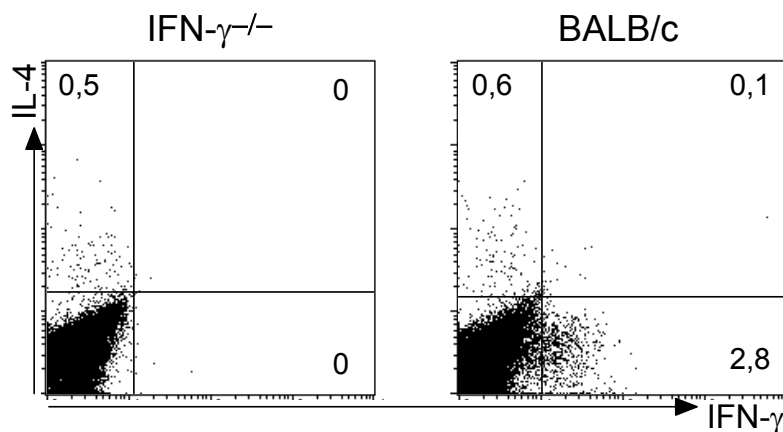


Abb. 4.13: IL-4 und IFN- γ Produktion von Splenozyten aus IFN- γ ^{-/-} und wildtyp BALB/c Mäusen. Dargestellt ist die IL-4 (y-Achse) und die IFN- γ (x-Achse) Produktion von IFN- γ ^{-/-} (links) und BALB/c (rechts) Splenozyten nach 4h Stimulation mit PMA/Ionomycin. In den Quadranten ist jeweils der Anteil der Zellen in Prozent angegeben.

Lymphozyten wurden aus Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark von IFN- γ ^{-/-} und wildtyp BALB/c Mäusen isoliert, und der Anteil TIM-3⁺ Zellen der CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen und der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde *ex vivo* durchflusszytometrisch bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab.4.6 zusammengefasst.

Die Expression von TIM-3 auf Th-Zellen und CD8⁺ T-Zellen liegt in allen untersuchten Organen bei naiven IFN- γ defizienten Mäusen und BALB/c wildtyp Kontrollen in vergleichbaren Bereichen (Tab. 4.6). Der Anteil TIM-3⁺ Zellen sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen liegt, soweit untersucht, in Milz, Lymphknoten und Thymus unter 1% und im Knochenmark zwischen 1 und 2%. In gesunden, unter SPF-Bedingungen gehaltenen Tieren hat das Fehlen von IFN- γ somit keinen Einfluss auf die TIM-3 Expression von T-Zellen. Es wurden jedoch naive Tiere untersucht, in denen es nur einen geringen Anteil IFN- γ Produzenten unter den Th-Zellen von weniger als 5% gibt (s. Abb. 4.13). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass IFN- γ nach Aktivierung einen Einfluss auf die Expression von TIM-3 haben könnte.

		Milz	Lymphknoten	Thymus	Knochenmark
IFN- γ ^{-/-} :	% TIM-3 ⁺ von	0,6 +/- 0,3	0,1 +/- 0,1	0,1 +/- 0,1	1,9
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	(n=8)	(n=3)	(n=3)	(n=1)
	% TIM-3 ⁺ von	0,7 +/- 0,3	0,1 +/- 0,1	0,4 +/- 0,6	1,3
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	(n=8)	(n=3)	(n=3)	(n=1)
IFN- γ ^{+/+} :	% TIM-3 ⁺ von	0,5 +/- 0,4	0,2 +/- 0,2	0,2 +/- 0,2	1,4
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	(n=12)	(n=6)	(n=3)	(n=1)
	% TIM-3 ⁺ von	0,5 +/- 0,2	0,3 +/- 0,2	0,3 +/- 0,4	2,4
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	(n=12)	(n=6)	(n=3)	(n=1)

Tab. 4.6: Vergleich der TIM-3 Expression in wildtyp und IFN- γ defizienten Mäusen. Die TIM-3 Expression auf T-Zellen von wildtyp BALB/c Mäusen und von IFN- γ defizienten BALB/c Mäusen wurde miteinander verglichen. Hierfür wurden Lymphozyten aus der Milz, aus Lymphknoten (inguinal, axial, mesenterial, periaortal), Thymus, und Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch die Expression von TIM-3 auf CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen bzw. CD3⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht. Angegeben ist jeweils der Mittelwert mit, soweit möglich, Standardabweichung und in Klammern die Anzahl der untersuchten Proben.

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Zellen, die TIM-3 exprimieren, nicht nur Zytokine wie IL-2, TNF- α , oder IFN- γ produzieren können, die mit einem Th1-Phänotyp in Verbindung stehen, sondern auch in der Lage sind, Th2-Zytokine wie IL-4 oder IL-5 herzustellen. Außerdem wurden Zellen gefunden, die gleichzeitig sowohl TIM-3 als auch T1/ST2 exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass TIM-3 nicht ausschließlich von Th1-Zellen exprimiert wird. Dennoch wird TIM-3 *in vitro* bevorzugt von Th1-Zellen gebildet und die Expression von TIM-3 ist in einem der untersuchten Th1-Infektionsmodelle in einigen aber nicht allen Geweben mit der pathogenspezifischen Produktion von Effektorzytokinen assoziiert.

4.3 Untersuchung der Funktion der TIM-3 Expression

Zu Beginn der Untersuchungen über die Expression des TIM-3 Moleküls auf T-Zellen gab es bis auf den Befund, dass TIM-3 auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Th2-Zellen verstärkt von Th1-Zellen exprimiert wird, keine weiteren Informationen. Aus diesem Grund wurden mehrere mögliche Funktionen der TIM-3 Expression auf Th-Zellen überprüft. Zunächst wurde untersucht, ob die Expression von TIM-3 einen Einfluss auf die thymische T-Zell-Reifung und die Verteilung von naiven (antigenunerfahrenen) und Gedächtnis-Th-Zellen hat. Ferner wurde analysiert, ob das Fehlen der TIM-3 Expression zu Änderungen in der Verteilung und der Anzahl verschiedener immunologisch relevanter Zellpopulationen führt. In Vorarbeiten der Kooperationspartner bei Millennium Pharmaceuticals wurde eine verstärkte TIM-3 Expression in Verbindung mit einem Th1-Phänotyp entdeckt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob TIM-3 eine Rolle bei der Differenzierung naiver Th-Zellen spielt. Weiterhin wurde eine Beteiligung der TIM-3 Expression bei der B-Zell-Hilfe in einem Immunisierungsmodell untersucht. MRL/lpr Mäuse, die einen natürlich entstandenen Defekt in der Apoptose haben, besitzen einen höheren Anteil TIM-3 exprimierender Th-Zellen. Wegen dieses Befunds wurde der Einfluss der Anwesenheit der TIM-3 Expression auf die Apoptose bedingte T-Zellhomöostase überprüft.

4.3.1 Einfluss auf die thymische T-Zell-Reifung

Änderungen der Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD8 erlauben eine Unterscheidung von Thymozytenpopulationen verschiedener Reifungsstadien. Im Thymus liegen die meisten Zellen als unreife $CD4^+ CD8^+$ T-Vorläuferzellen vor, nur ein kleiner Anteil sind reife $CD4^+ CD8^-$ oder $CD4^- CD8^+$ T-Zellen (s. 1.1). Um festzustellen, ob das Fehlen von TIM-3 einen Einfluss auf die thymische T-Zell-Entwicklung hat, wurden Thymozyten von TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen gewonnen und durchflusszytometrisch der Phänotyp der sich entwickelnden und reifen T-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.14 zusammengefasst.

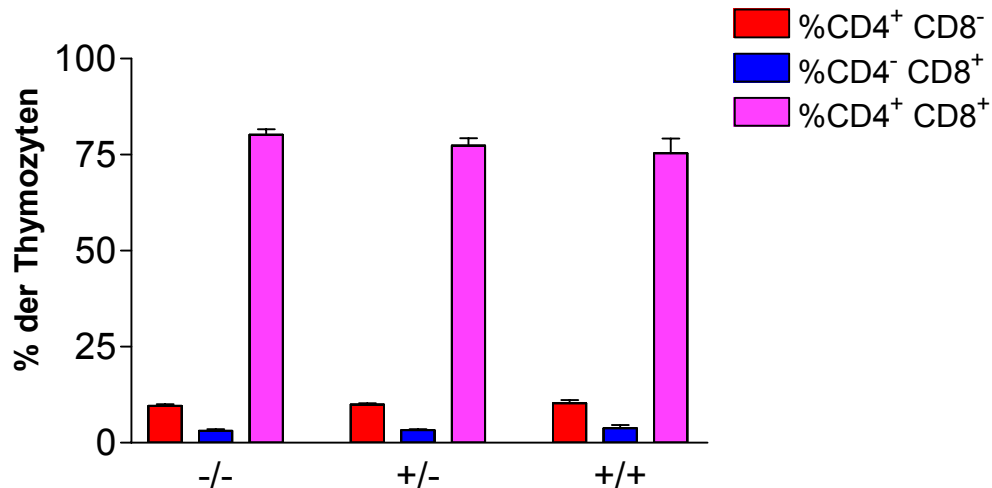


Abb. 4.14: CD4 CD8 Populationen im Thymus von TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen. Thymozyten von TIM-3^{-/-} (-/-), TIM-3^{+/-} (+/-) und TIM-3^{+/+} (+/+) Mäusen wurden durchflusszytometrisch auf den Anteil CD4⁺ CD8⁻ (rote Balken), CD4⁻ CD8⁺ (blaue Balken) und CD4⁺ CD8⁺ Zellen (rosa Balken) untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen.

Abb.4.14 zeigt, dass ungefähr 75% der Thymozyten als unreife CD4⁺ CD8⁺ T-Vorläuferzellen vorliegen. Das gilt sowohl für wildtyp Mäuse (+/+) als auch für heterozygot (+/-) und homozygot (-/-) TIM-3 defiziente Tiere. Auch bei den reifen CD4⁺ CD8⁻ und CD4⁻ CD8⁺ T-Zellen liegen die Anteile bei allen Gruppen in vergleichbaren Bereichen innerhalb der Standardabweichungen. Somit hat die Expression von TIM-3 keinen Einfluss auf die thymische T-Zellentwicklung.

4.3.2 Einfluss auf die Zellhomöostase und die Organverteilung

Nun wurde untersucht, ob das Fehlen von TIM-3 zu einer Verschiebung der Organverteilung und der Homöostase immunologischer Zellpopulationen führt. Lymphozyten wurden aus der Milz, aus vereinigten inguinalen, axialen und mesenterialen Lymphknoten (LN), dem Thymus, dem Knochenmark (KM), und aus peripherem Blut isoliert und auf die Verteilung von Th-Zellen (CD3⁺CD4⁺), zytotoxischen T-Zellen (ZTL, CD3⁺CD8⁺), B-Zellen (MHCII⁺CD19⁺), Makrophagen (CD11b⁺CD11c⁻) und dendritischen Zellen (CD11b^{lo}CD11c⁺) in TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen untersucht. In Tab. 4.7 sind die ermittelten Frequenzen zusammengefasst. Die Gesamtzahl der aus den unterschiedlichen Geweben isolierten Lymphozyten lag für TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäuse in vergleichbaren Bereichen (Daten nicht gezeigt).

		Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	ZTL (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	B-Zellen (MHCII ⁺ CD19 ⁺)	dendritische Zellen (CD11b ^{lo} CD11c ⁺)	Makrophagen (CD11b ^{hi} CD11c ⁻)
<u>Milz:</u>	TIM-3 ^{-/-} :	24,6+/-2,1	10,1+/-1,2	48+/-3,2	0,3+/-0,1	1,9+/-1,1
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/-} :	25,5+/-1,9	11,3+/-1,2	44,5+/-6,1	0,3+/-0,1	1,7+/-0,9
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/+} :	23,6+/-1,9	10,8+/-0,9	44+/-5,7	0,4+/-0,2	2+/-0,3
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
<u>LN:</u>	TIM-3 ^{-/-} :	55,3+/-3,5	19,1+/-1,0	21,4+/-2,9	0,1+/-0	0,1+/-0
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/-} :	55,3+/-3,5	19,1+/-1,0	21,4+/-2,9	0,1+/-0	0,1+/-0,1
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/+} :	55,1+/-3,7	18,8+/-1,9	19,4+/-2,7	0,1+/-0,1	0,1+/-0,1
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
<u>Thymus:</u>	TIM-3 ^{-/-} :	9,9+/-1,0	3,4+/-0,4	0,3+/-0,1	0,1+/-0,1	0,1+/-0
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/-} :	10,2	3,3	0,3+/-0,1	0+/-0,1	0,1+/-0
		(n=2)	(n=2)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/+} :	9,7+/-2,6	3,8+/-1,3	0,2+/-0,1	0,1+/-0,1	0,1+/-0
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
<u>KM:</u>	TIM-3 ^{-/-} :	0,4+/-0,1	0,4+/-0,1	19,1+/-4,9	0,3+/-0,1	38,9+/-3,2
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/-} :	0,5+/-0,1	0,5+/-0,1	17,9+/-3,8	0,4+/-0,2	38,5+/-2,2
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/+} :	0,4+/-0,2	0,3+/-0,1	24+/-3,4	0,3+/-0,1	34,9+/-2,5
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
<u>Blut:</u>	TIM-3 ^{-/-} :	15,6+/-11,3	4,4+/-3,5	14,1+/-5,1	0,5+/-0,1	7,2+/-3,9
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/-} :	20,9+/-11,6	6+/-3,3	11,8+/-4,9	0,4+/-0,2	5,9+/-3,7
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	TIM-3 ^{+/+} :	13,6+/-16,5	4,3+/-5,1	11,5+/-9,8	0,5+/-0,4	8+/-7,3
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)

Tab. 4.7: Verteilung der Zellpopulationen in verschiedenen Organen in TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen. Lymphozyten wurden aus TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen aus Milz, Lymphknoten (LN: inguinale, axiale und mesenteriale), Thymus, Knochenmark (KM) und Blut isoliert. Die Frequenz an T-Helfer-Zellen (Th: CD3⁺ CD4⁺), Zytotoxischen T-Zellen (ZTL: CD3⁺ CD8⁺), B-Zellen (MHCII⁺ CD19⁺), dendritischen Zellen (CD11c⁺ CD11b^{lo}), und Makrophagen (CD11c⁻ CD11b^{hi}) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben ist der Mittelwert des Anteils der jeweiligen Population an lebenden Lymphozyten im jeweiligen Organ in Prozent mit, soweit möglich, Standardabweichung und die Anzahl der untersuchten Tiere von 3 unabhängigen Versuchen.

In allen untersuchten Organen und Geweben wurden zwischen TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen vergleichbare Mengen und Frequenzen von T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen gemessen (Tab. 4.7). Das Fehlen der TIM-3 Expression beeinflusst somit nicht die Entstehung und die Verteilung dieser Zellpopulationen.

4.3.3 Einfluss auf die Verteilung von naiven, Gedächtnis und regulatorischen Th-Zellen

Obwohl CD62L (L-Selektin) auch von einigen Gedächtniszellen exprimiert wird, handelt es sich bei der Mehrheit der CD62L⁺ T-Zellen um naive, antigenunerfahrene T-Zellen (Dutton et al., 1998). Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des IL-2 Rezeptors. CD25 wird kurzzeitig von aktivierten CD4⁺ Th-Zellen und von CD4⁺ Th-Zellen mit regulatorischen Funktionen exprimiert (Sakaguchi et al., 1985; Sakaguchi et al., 2001). Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil CD62L⁺ und CD25⁺ Zellen an den CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen in der Milz und den jeweils vereinigten mesenterialen, inguinalen und axialen Lymphknoten von TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen *ex vivo* bestimmt. In Abb. 4.15 sind die für Milzzellen erhaltenen Daten zusammengefasst.

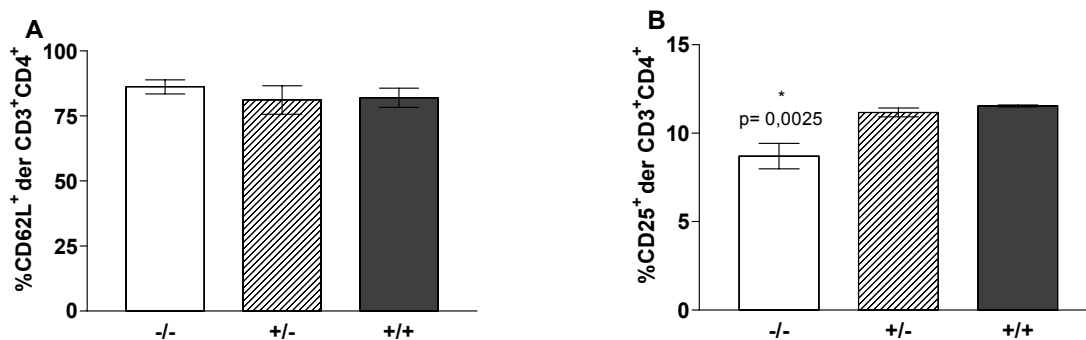


Abb. 4.15: Vergleich der Frequenzen von CD62L⁺ und CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Milz von TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen. Der Anteil CD62L⁺ (A) und CD25⁺ (B) CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen wurde über Durchflusszytometrie bei Splenozyten nach Erythrozytenlyse von TIM-3^{-/-}, TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen bestimmt. Tote Zellen wurden mittels PI-Markierung aus der Auswertung ausgeschlossen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Markierung mit anti-CD62L zeigt, dass die Population naiver Th-Zellen in der Milz in allen Gruppen in normalen Bereichen zwischen 80 bis 90% liegt und somit von der Abwesenheit der TIM-3 Expression nicht beeinflusst wird (Abb. 4.15 A). Ebenso verhält es sich im Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Abb. 4.15 B zeigt, dass bei TIM-3^{-/-} Mäusen ein etwas geringerer Anteil der CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen in der Milz CD25⁺ ist als bei TIM-3^{+/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen. Der p-Wert von 0,0025 deutet an, dass dieser Unterschied signifikant ist. Gleichwohl liegt der Anteil von CD25⁺ Zellen in normalen Mäusen bei 5-10% der CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie (Piccirillo and Shevach, 2001). Mit 8,7 +/- 0,7% der CD3⁺ CD4⁺ Th-Zellen liegt der Anteil der CD25⁺ Zellen bei den TIM-3^{-/-} Mäusen somit in normalen Bereichen. Die Frequenz naiver und regulatorischer Th-Zellen sowie von Gedächtniszellen scheint somit nicht durch die Abwesenheit der TIM-3 Expression beeinflusst zu sein.

4.3.4 Einfluss auf die Differenzierung von Th-Zellen

4.3.4.1 Einfluss von anti-TIM-3 Antikörper und TIM-3 Fusionsprotein

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass TIM-3 *in vitro* bevorzugt von Th1-Zellen exprimiert wird. Um zu überprüfen, ob TIM-3 einen Effekt auf die Differenzierung naiver Th-Zellen hat, wurde der Einfluss der Anwesenheit von anti-TIM-3 Antikörpern oder von TIM-3 Fusionsprotein während der Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen unter polarisierenden und nichtpolarisierenden Bedingungen untersucht. Hierfür wurden naive CD4⁺ CD62L⁺ Th-Zellen aus den Milzen von BALB/c Mäusen mittels MACS aufgereinigt. Die eingesetzten Zellen waren in allen Versuchen zu mindestens 99% CD4⁺ und zu mindestens 95% CD4⁺ CD62L⁺. Die naiv sortierten Th-Zellen wurden in Kultur genommen und in unterschiedlichen Ansätzen unter nichtpolarisierenden Th0-, polarisierenden Th1- oder Th2-Bedingungen mit plattengebundenen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert (s. 3.2.5.2). Zusätzlich enthielten die Ansätze 10µg/ml anti-TIM-3 (Klon 8H7) oder 20µg/ml TIM-3-Ig Fusionsprotein entweder plattengebunden oder löslich. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne weitere Zusätze oder mit 10µg/ml eines unspezifischen Antikörpers des gleichen Isotyps wie anti-TIM-3 (Klon 8H7) plattengebunden. Dabei sollte plattengebundener anti-TIM-3 Antikörper TIM-3 Moleküle auf der Oberfläche der Zellen quervernetzen und eventuelle Signale ins Zellinnere auslösen. Mit plattengebundenem TIM-3-Ig Fusionsprotein sollte ein eventuell vorhandener Ligand auf den Zellen kreuzvernetzt werden. Die Zugabe von löslichem anti-TIM-3 Antikörper bzw. löslichem TIM-3-Ig Fusionsprotein sollte das Entstehen über TIM-3 vermittelter Signale verhindern. Die Linien wurden, wie in 3.5.2.2 beschrieben, wöchentlich restimuliert. Jeweils 7 Tage nach der Primärstimulation (Tag7) bzw. der ersten (Tag 14) oder der zweiten (Tag 21) Restimulation wurden die Zellen geerntet, über Dichtegradientenzentrifugation von toten Zellen befreit und für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Als Kriterium für den Polarisierungszustand wurde der Anteil der IL-4 und der IFN-γ Produzenten in den Kulturen über intrazelluläre Durchflusszytometrie bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil der IL-10 Produzenten bestimmt (Daten nicht gezeigt). In Abb. 4.16 sind die für den Zeitpunkt Tag 14 erhaltenen Resultate dargestellt. Die Ergebnisse an Tag 7 und Tag 21 waren vergleichbar.

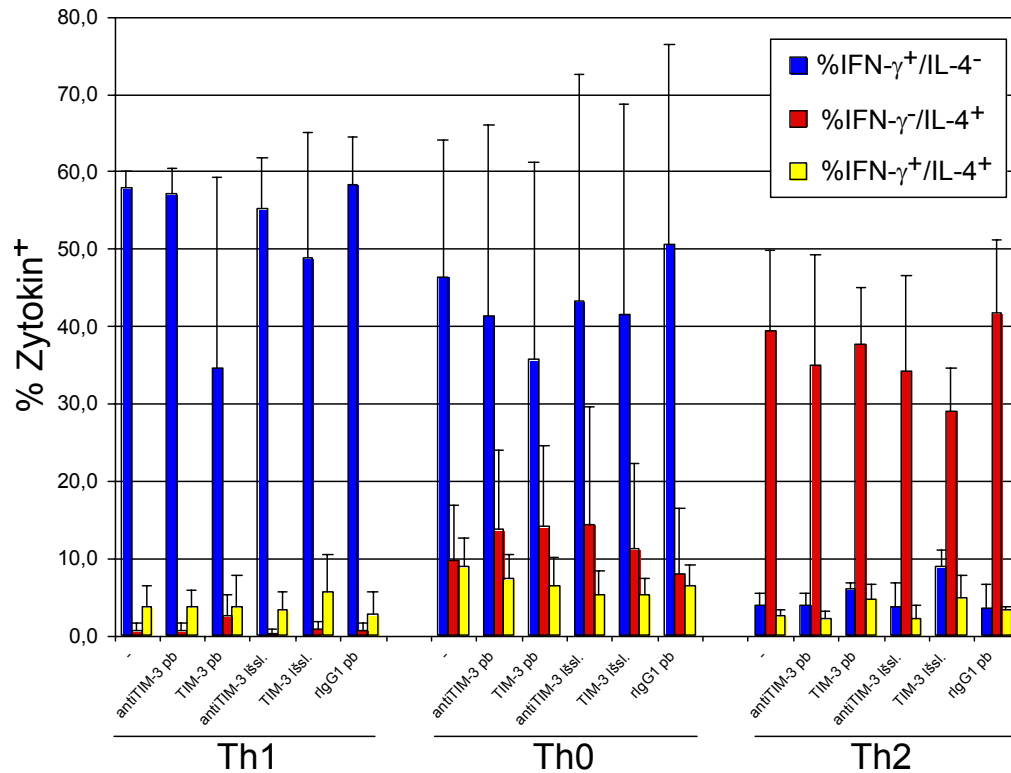


Abb. 4.16: Einfluss von anti-TIM-3 oder TIM-3 Fusionsprotein auf die Polarisierung naiver Th-Zellen. Naive CD4 $^+$ CD62L $^+$ Zellen wurden mittels MACS aus Milzen von BALB/c Mäusen aufgereinigt und *in vitro* mit plattengebundenen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern allein oder zusätzlich mit anti-TIM-3 plattengebunden (pb) oder löslich (lösl.) oder TIM-3 Ig Fusionsprotein plattengebunden (pb) oder löslich (lösl.) oder einem Kontroll-Antikörper plattengebunden unter Th1- (mit rek. IL-12 und anti-IL-4, links) oder Th2- (mit rek. IL-4 und anti-IL-12, rechts) polarisierenden Bedingungen oder ohne weitere polarisierende Zusätze unter Th0-Bedingungen (Mitte) kultiviert. Nach 7 Tagen wurden tote Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt und die Kulturen auf die gleiche Weise restimuliert. Nach weiteren 7 Tagen wurden tote Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt und die Kulturen unspezifisch für 4h restimuliert. Nach den ersten 2h wurde Brefeldin A zugefügt, um Zytokinsekretion zu verhindern. Die Zellen wurden fixiert und der Anteil der IFN- γ und IL-4 Produzenten über intrazelluläre Durchflusszytometrie bestimmt. Auf der x-Achse ist die jeweilige Kultur aufgetragen gegen den Anteil IFN- γ^+ IL-4 $^-$ (blaue Balken), IFN- γ^- IL-4 $^+$ (rote Balken) und IFN- γ^+ IL-4 $^+$ (gelbe Balken) Zellen auf der y-Achse. Gezeigt sind die gemittelten Werte mit Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In Abb. 4.16 sieht man, dass unter Th1-Bedingungen, also in Anwesenheit von IL-12 und blockierendem anti-IL-4 Antikörper, bis zu 60% der Zellen IFN- γ Produzenten sind. Der Anteil der IL-4 Einzelproduzenten liegt unter 3%. Die Zellen, die unter Th1-Bedingungen kultiviert wurden, weisen somit einen klaren Th1-Phänotyp, gemessen an ihrer

Zytokinproduktion, auf. Das gilt für alle Kulturen und auch in Anwesenheit von anti-TIM-3 bzw. TIM-3 Fusionsprotein. Unterschiede in den Anteilen zwischen den Kulturen liegen innerhalb der Variabilitätsbereiche der Standardabweichungen. Dieselbe Aussage trifft für die Ansätze unter Th0- und unter Th2-Bedingungen zu.

Zu keinem Zeitpunkt und mit keinem der Zusätze ist ein Einfluss auf die T-Zell-Polarisierung, gemessen als Anteil IL-4 bzw. IFN- γ Produzenten in den Kulturen erkennbar. Daher hat der Zusatz von TIM-3 bzw. anti-TIM-3 Antikörper (Klon 8H7), löslich oder plattengebunden, keinen Einfluss auf die Polarisierung naiver Th-Zellen *in vitro*.

4.3.4.2 Untersuchung TIM-3 defizienter Mäuse

In dem eben beschriebenen Versuch wurden aufgereinigte naiv sortierte Th-Zellen verwendet und mit monoklonalen Antikörpern ohne Zusatz von APZ aktiviert. In den anfangs beschriebenen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass TIM-3 auch von anderen Zellen als T-Zellen, nämlich Makrophagen und dendritischen Zellen, die zu den APZ gehören, exprimiert wird. Mit dem folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob das Fehlen von TIM-3 einen Einfluss auf die Th-Zell-Differenzierung *in vitro* in Anwesenheit von APZ hat. Zu diesem Zweck wurde die Gesamtheit der Splenozyten nach Entfernen der Erythrozyten mittels hypotonen Schocks (s. 3.2.2.2) von TIM-3 defizienten Mäusen oder ihren wildtyp Geschwistern mit löslichen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern *in vitro* unter Th0-, Th1- und Th2-Bedingungen kultiviert. Nach 7 Tagen wurden tote Zellen über Dichtegradientenzentrifugation entfernt und die Zellen für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert. Brefeldin A wurde nach 2 Stunden der Stimulation zugefügt, um die Sekretion der produzierten Zytokine zu verhindern. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Produktion von IL-4, IL-10, IL-5, IL-2, TNF- α und IFN- γ der CD4⁺ Zellen bestimmt, um den Phänotyp der Th-Zellen zu bestimmen. Abb. 4.17 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Abb. 4.17 zeigt, dass nach einer Woche mehr als 20% der unter Th1-Bedingungen kultivierten Zellen IFN- γ Produzenten sind und weniger als 2% der CD4⁺ Zellen IL-4 herstellen. Es ist kein Unterschied zwischen TIM-3 defizienten und wildtyp Zellen erkennbar, der nicht innerhalb des Variabilitätsbereiches der Standardabweichungen liegt. Unabhängig davon, ob eine TIM-3 Expression vorhanden ist oder nicht, differenzieren die Th-Zellen also in Anwesenheit von IL-12 und blockierendem anti-IL-4 Antikörper zu einem Th1-Phänotyp. Die Zellen, die unter Th2-Bedingungen mit rekombinant hergestelltem IL-4 und blockierenden anti-IL12 und anti-IFN- γ Antikörpern kultiviert wurden, enthalten nach einer Woche 20 bis über 30% IL-4 Produzenten und einen geringen Anteil IFN- γ Produzenten. Sie haben sich also zu Th2-Zellen entwickelt, gleichgültig, ob sie in der Lage sind, TIM-3 zu exprimieren oder nicht.

Das Fehlen des TIM-3 Moleküls hat somit keinen Einfluss auf die Polarisierung der CD4⁺ Zellen *in vitro*. Zwischen TIM-3 defizienten Mäusen und ihren wildtyp Geschwistern ist eine Woche nach Stimulation auch unter Th0-Bedingungen mit löslichen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern kein Unterschied in der Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-10, IL-4 und IL-5 zu erkennen, der außerhalb der Variabilitätsbereiche der Standardabweichungen liegt. Auch auf eine Th1-Polarisierung mit anti-IL-4 und rekombinant hergestelltem IL-12 bzw. eine Th2-Polarisierung mit anti-IL12 und anti-IFN- γ und rekombinant hergestelltem IL-4 reagieren die Zellen aus der TIM-3 defizienten Maus mit einer Zytokinproduktion, die sowohl qualitativ als auch quantitativ mit Zellen der wildtyp Maus vergleichbar ist. Somit scheint das Vorhandensein bzw. das Fehlen des TIM-3 Moleküls keinen entscheidenden Einfluss auf das Zytokinsekretionsprofil der T-Helfer-Zellen und auf ihre Polarisierung zu haben.

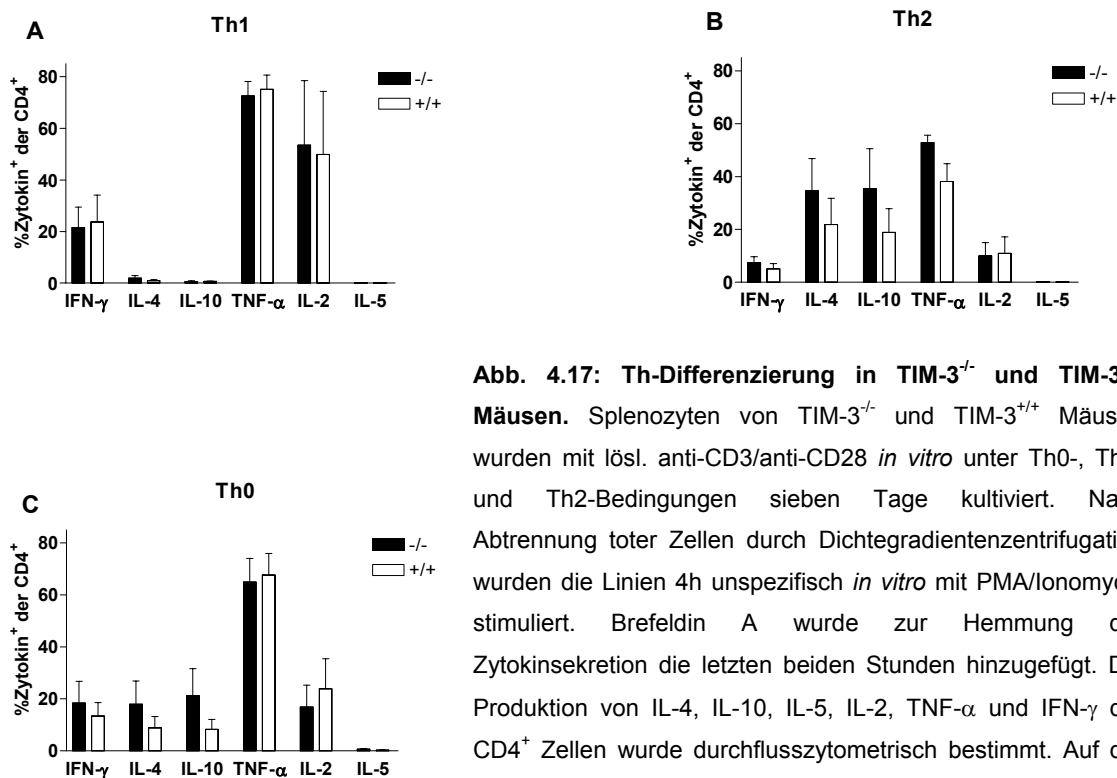


Abb. 4.17: Th-Differenzierung in TIM-3^{-/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen. Splenozyten von TIM-3^{-/-} und TIM-3^{+/+} Mäusen wurden mit lösl. anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* unter Th0-, Th1- und Th2-Bedingungen sieben Tage kultiviert. Nach Abtrennung toter Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation wurden die Linien 4h unspezifisch *in vitro* mit PMA/Ionomycin stimuliert. Brefeldin A wurde zur Hemmung der Zytokinsekretion die letzten beiden Stunden hinzugefügt. Die Produktion von IL-4, IL-10, IL-5, IL-2, TNF- α und IFN- γ der CD4⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Auf der y-Achse ist der Anteil der jeweils auf der x-Achse angegebenen Zytokine in Prozent der CD4⁺ in den Th1- (A), Th2-(B) und Th0- (C) Linien aus TIM-3^{-/-} (schwarze Balken) und TIM-3^{+/+} (weiße Balken) aufgetragen. Abgebildet ist der Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils drei verschiedenen T-Zelllinien.

4.3.5 Einfluss auf die Antikörper-Antwort nach einer Immunisierung

Eine defiziente Expression bestimmter Oberflächenmoleküle kann fatale Folgen für die Immunantwort haben. So führt zum Beispiel ein durch natürliche Mutation entstandener homozygoter Verlust des kostimulatorisch wirkenden Oberflächenmoleküls ICOS auf T-Zellen beim Menschen zur Ausbildung einer schweren Immundefizienz (Grimbacher et al., 2003). Die betroffenen Patienten sind nicht in der Lage, geeignete Antikörperantworten zu erzeugen. In TIM-3 defizienten Mäusen wurde deshalb untersucht, ob das Fehlen von TIM-3 einen Einfluss auf die von Th-Zellen vermittelte humorale Immunantwort nach einer Immunisierung hat.

TIM-3 defiziente Mäuse und ihre wildtyp Geschwister wurden mit 100µg OVA in Alum primärimmunisiert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde Serum aus dem Blut der Tiere gewonnen. Am Tag 21 wurden die Tiere mit 50µg OVA in PBS intravenös ein zweites Mal immunisiert. 7 und 14 Tage danach wurde den Tieren wieder Blut zur Serumgewinnung entnommen. Mittels ELISA wurde jeweils der Titer OVA spezifischer Antikörper folgender Subklassen ermittelt: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA (s. 3.3). In Abb. 4.18 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Für alle untersuchten Ig-Subtypen ist der antigenspezifische Ig-Titer zwischen TIM-3 defizienten Tieren und ihren wildtyp Geschwistern vergleichbar und liegt innerhalb der Variabilitätsbereiche der Standardabweichungen (Abb. 4.18). Das gilt sowohl nach Primär- als auch nach Sekundärimmunisierung. Die Titer der einzelnen Subtypen nehmen mit vergleichbaren Kinetiken zu und liegen zu allen betrachteten Zeitpunkten in vergleichbaren Bereichen. Somit hat das Fehlen des TIM-3 Moleküls keinen Einfluss auf die humorale Immunantwort, welche anhand der Zunahme antigenspezifischer Immunglobuline im Serum immunisierter Mäuse gemessen wurde. Auch der Klassenwechsel scheint nicht von der Anwesenheit des TIM-3 Moleküls abzuhängen. Der Titer für die verschiedenen IgGs und IgA ist jeweils zu allen Zeitpunkten vergleichbar zwischen TIM-3 defizienten Tieren und ihren normalen Geschwistern.

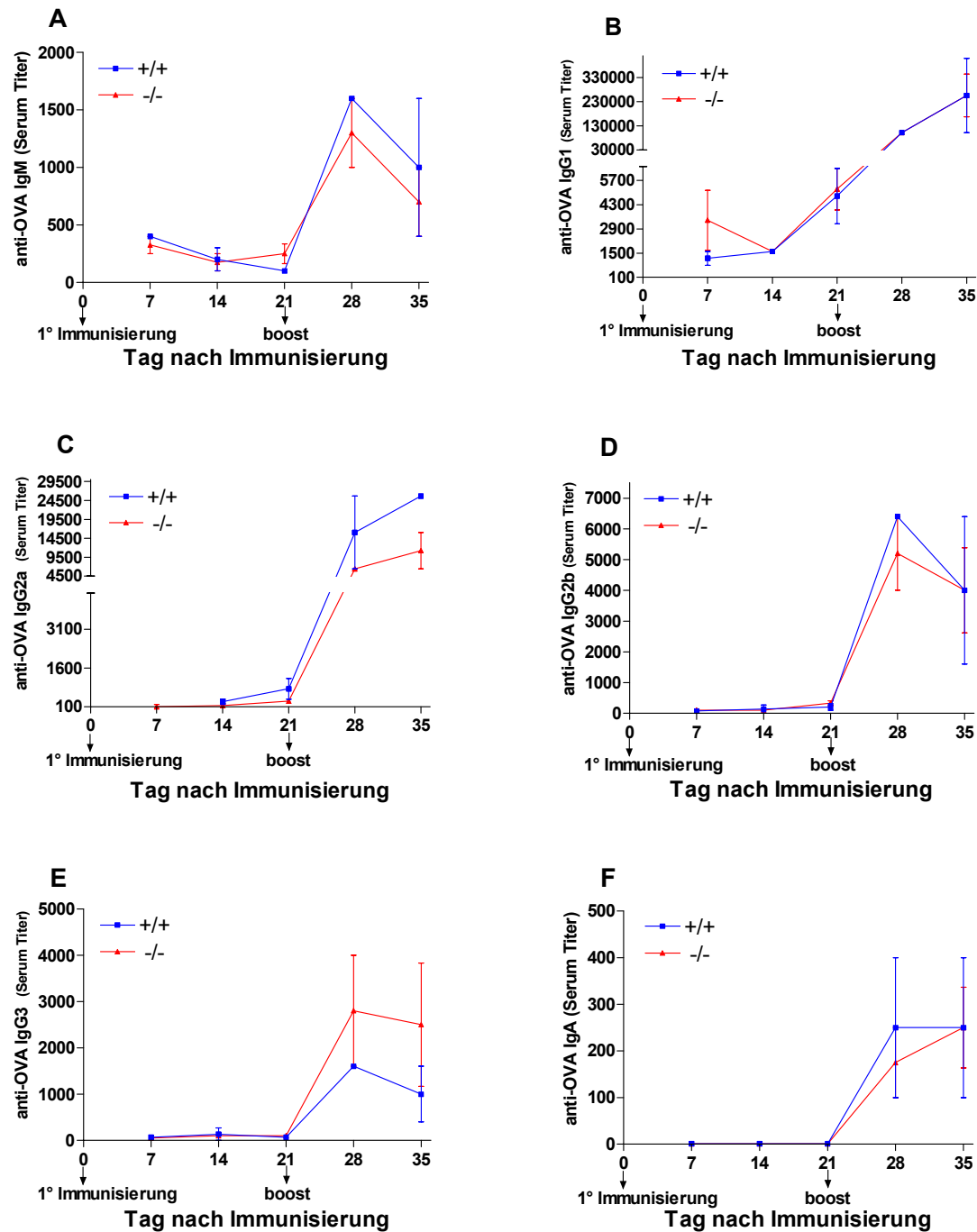


Abb. 4.18: Ag-spezifische Ig-Antwort in wildtyp und TIM-3 defizienten Mäusen nach Primär- und Sekundärimmunisierung. TIM-3 defiziente Mäuse bzw. deren wildtyp Geschwister wurden *i.p.* mit 100µg OVA in Alum primärimmunisiert (1° Immunisierung). Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde Serum aus dem Blut der Tiere gewonnen. An Tag 21 wurden die Tiere sekundärimmunisiert (boost) mit 50µg OVA in PBS *i.v.*. 7 und 14 Tage danach wurde den Tieren wieder Blut zur Serumgewinnung entnommen. Mittels ELISA wurde der Serum Titer OVA spezifischer Antikörper verschiedener Subklassen ermittelt. Als Titer wurde die Serumverdünnung gewählt, die größer/gleich dem fünffachen Hintergrund war. Gezeigt ist der Serum Titer für OVA spezifische IgM- (A), IgG1- (B), IgG2a- (C), IgG2b- (D), IgG3- (E) und IgA- (F) Antikörper. Auf der y-Achse ist jeweils der Titer als Verdünnungsfaktor und auf der x-Achse die Tage nach der Primärimmunisierung aufgetragen. Mit Pfeilen sind die Immunisierungszeitpunkte gekennzeichnet. Abgebildet ist der Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils 4 untersuchten Tieren.

4.3.6 Einfluss auf die T-Zell-Apoptose

Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) ist ein Superantigen, welches in Mäusen spezifisch solche T-Zellen aktiviert, die das V β 8-Segment in ihrem T-Zell-Rezeptor besitzen (Kawabe and Ochi, 1990; Rellahan et al., 1990). Nach Aktivierung mit SEB steigt der Anteil der V β 8⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie durch klonale Expansion zunächst stark an und nimmt anschließend über klonale Deletion durch Apoptose wieder ab (Kawabe and Ochi, 1991).

Hier sollte überprüft werden, ob das Fehlen von TIM-3 einen Einfluss auf diese über Apoptose regulierte T-Zellhomöostase hat. In zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils TIM-3^{-/-} und wildtyp BALB/c Mäuse mit 50 μ g SEB in PBS *i.v.* immunisiert. 2, 4 und 7 Tage später wurde je einem Tier die Milz entnommen und der Anteil V β 8.1,8.2⁺ Zellen der CD4⁺ bzw. der CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Als Nullwert diente jeweils eine mit PBS immunisierte Kontrolle. Die in diesen Versuchen verwendeten TIM-3 defizienten Mäuse waren lediglich zweimal auf den BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt. In Abb.4.19 sind die erhaltenen Ergebnisse für CD4⁺ Th-Zellen (A) und für CD8⁺ T-Zellen (B) dargestellt.

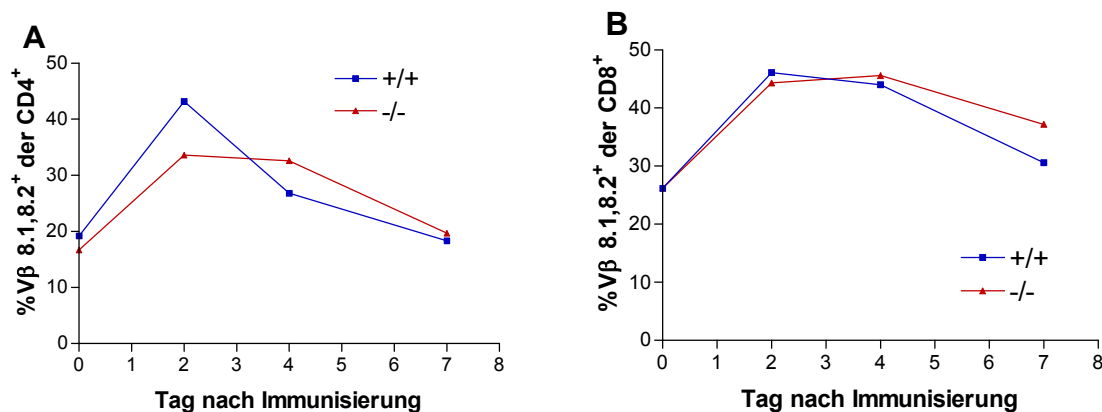


Abb. 4.19: Klonale Expansion V β 8⁺ T-Zellen in TIM-3^{-/-} und wildtyp BALB/c Mäusen nach *i.v.* Immunisierung mit SEB. TIM-3^{-/-} (rote Linie) und wildtyp BALB/c (blaue Linie) Mäuse wurden an Tag 0 mit 50 μ g SEB in PBS *i.v.* immunisiert und der Anteil V β 8.1,8.2⁺ der CD4⁺ (A) bzw. der CD8⁺ T-Zellen (B) in der Milz an Tag 2, 4 und 7 durchflusszytometrisch bestimmt. Als Nullwert diente jeweils eine lediglich mit PBS immunisierte Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

Der Verlauf der klonalen Expansion der V β 8.1,8.2⁺ Zellen als Antwort auf eine Behandlung mit SEB ist bei den TIM-3 defizienten Mäusen mit dem bei TIM-3 exprimierenden BALB/c Mäusen vergleichbar. In der CD4⁺ T-Zell-Population wurde bis Tag 2 ein Anstieg des Anteils V β 8.1,8.2⁺ Zellen und von Tag 2 bis Tag 7 eine Abnahme beobachtet. Die in Abb. 4.19 A beobachtete Differenz zwischen TIM-3^{-/-} Mäusen und BALB/c Mäusen lag in einem Wiederholungsversuch im normalen Verteilungsbereich. Für die CD8⁺ T-Zellen liegen die

Kurven enger beieinander. Der prozentuale Anteil $V\beta 8.1,8.2^+$ Zellen sowohl der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ T-Zellen liegt folglich vor und nach Immunisierung mit SEB in vergleichbaren Bereichen. Da hinsichtlich der klonalen Expansion $V\beta 8^+$ T-Zellen als Antwort auf eine SEB-Injektion kein Unterschied zwischen TIM-3 defizienten und wildtyp BALB/c Mäusen erkennbar war, wurde darauf verzichtet, diesen Versuch mit öfter als zweimal auf den BALB/c Hintergrund zurückgekreuzten Tieren zu wiederholen. Die Fähigkeit zur Regulation der T-Zellhomöostase durch Apoptose scheint somit durch das Fehlen von TIM-3 nicht beeinträchtigt zu sein.

5 Diskussion

Th-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Immunantworten. Mithilfe der von ihnen produzierten Zytokine und ihren Effektorfunktionen können Th-Zellen in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Am besten charakterisiert sind bislang Th1- und Th2-Zellen, die vorrangig aufgrund der von ihnen exprimierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Murphy and Reiner, 2002). Zytokine werden jedoch transient sezerniert und sind in den meisten Fällen nur nach einer *in vitro* Stimulation in fixierten und permeabilisierten Zellen detektierbar. Die Expression von Transkriptionsfaktoren kann bislang nur auf mRNA-Ebene untersucht werden, wobei die Zellen lysiert werden müssen. Mithilfe differenziell und stabil exprimierter Oberflächenmoleküle wäre eine einfache Identifizierung intakter, lebender und unbehandelter Zellen möglich. Dies würde die Untersuchung von Th1- und Th2-Zellen bei verschiedenen Immunantworten vereinfachen. Möglicherweise können durch solche Moleküle auch Immunantworten moduliert und Krankheiten therapiert werden. Bislang gibt es ein Protein, T1/ST2, das spezifisch nur von Th2-Zellen und nicht von Th1-Zellen exprimiert wird und auch eine Bedeutung für Th2-Effektorfunktionen hat (Löhning et al., 1998; Meisel et al., 2001; Xu et al., 1998a). Es existiert jedoch bislang kein Oberflächenmolekül, welches zuverlässig und spezifisch nur von Th1-Zellen exprimiert wird. Bei der Suche nach solchen Molekülen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Millennium Pharmaceuticals ein auf mRNA-Ebene stärker von Th1-Zellen exprimiertes und bislang unbekanntes Oberflächenmolekül, TIM-3, identifiziert. In dieser Arbeit wurden die Expression des TIM-3 Proteins und mögliche Funktionen dieser Expression für Th-Zellen untersucht.

5.1 Expression von TIM-3

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war, die TIM-3 Expression auf Proteinebene zu charakterisieren. Mithilfe eines monoklonalen Antikörpers, welcher spezifisch murines TIM-3 erkennt und direkt oder indirekt mit Fluorochromen konjugiert wurde, konnte die Expression von TIM-3 auf verschiedenen Zellen des Immunsystems am Durchflusszytometer ermittelt werden. Die Spezifität der Markierung wurde durch Blockieren sowohl mit unkonjugiertem anti-TIM-3 Antikörper als auch mit rekombinant hergestelltem TIM-3 Fusionsprotein überprüft.

TIM-3 wurde, wie bereits erwähnt, bei einer Untersuchung muriner Th1- und Th2-Zell-Linien nach differenziell exprimierten Molekülen entdeckt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TIM-3 kein Th-spezifisches Molekül ist, sondern neben Th-Zellen auch von CD8⁺ T-Zellen und γ/δ -T-Zellen sowie von einigen APZ, nämlich einem Teil der Makrophagen und der Mehrheit der dendritischen Zellen, in der Milz naiver Mäuse exprimiert wird. Die TIM-3

Expression könnte daher für eine Vielzahl unterschiedlicher Immunzellen von Bedeutung sein. Es wurde keine TIM-3 Expression auf B-Zellen gefunden. Die Expression des TIM-3 Moleküls scheint sich auf Zellen zu beschränken, die vor allen Dingen bei zellulären Immunantworten eine Rolle spielen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass TIM-3 auch von weiteren Zellen, wie NK-Zellen, NK-T-Zellen, Epithelzellen und Stromazellen exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das nicht weiter verfolgt. Um ein vollständigeres Bild der TIM-3 Expression auf Zellen des Immunsystems zu gewinnen, wäre es sinnvoll die Expression von TIM-3 auf weiteren Zell-Populationen zu untersuchen. Es sind jedoch für einige dieser Zellen, wie beispielsweise Stromazellen, keine geeigneten Oberflächenmoleküle zur genauen Identifizierung und Kennzeichnung bekannt. Bei den dendritischen Zellen wurden verschiedene Subpopulationen identifiziert, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden (Shortman and Liu, 2002). In der Maus gibt es insgesamt fünf verschiedene Populationen von denen drei in der Milz gefunden werden können. Dendritische Zellen sind häufig die ersten Zellen des Immunsystems, die mit eindringenden Pathogenen in Kontakt kommen. Ihnen werden grundlegende Funktionen bei der Wahl und der Erzeugung der geeigneten Immunantwort zugesprochen (Palucka and Banchereau, 2002). Die Expression von TIM-3 könnte mit einer bestimmten Subpopulation in Verbindung stehen. Das könnte durch weitere Untersuchungen mithilfe verschiedener Oberflächenmoleküle wie CD11c, CD11b, CD8 α , CD4 und CD205, die zur Unterscheidung reifer, muriner dendritischer Zellpopulationen verwendet werden, überprüft werden. Sollte sich die Expression von TIM-3 auf eine oder mehrere Subpopulationen beschränken, könnte das mehr Aufschluss über dessen Funktion für dendritische Zellen und eventuell auch für T-Zellen geben.

In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen auf die Analyse der TIM-3 Expression auf T-Zellen beschränkt. Es wurde untersucht, ob TIM-3 exprimierende T-Zellen sich bevorzugt in bestimmten Organen aufhalten oder gleichmäßig im Organismus verteilt sind. Unterschiede in der TIM-3 Expression im gesunden, unter SPF-Bedingungen gehaltenen Tier konnten zwischen fünf untersuchten, unterschiedlichen Mausstämmen ausgeschlossen werden. In der naiven Maus wird TIM-3 von 0,5 bis max. 1,5% der Th-Zellen in den primären (Thymus, Knochenmark) und sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) exprimiert. Ähnliche Werte für die TIM-3 Expression wurden auf T-Lymphozyten in der Leber ermittelt. Ein leicht erhöhter Anteil wurde bei IEL und LPL aus dem Dünndarm gefunden und weist auf eine unterschiedliche Expression des TIM-3 Moleküls in diesen Geweben hin. IEL und LPL gehören zum spezialisierten lymphatischen Gewebe des Gastrointestinaltrakts. In der Lamina Propria gehören CD4⁺ T-Zellen zur größten Fraktion der T-Lymphozyten und weisen im Vergleich zu T-Zellen im peripheren Blut eine erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen auf, die charakteristisch für aktivierte T-Zellen und Gedächtniszellen

sind, wie CD69, CD44, CD45RB und CD62L (Schieferdecker et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das TIM-3 Protein von aktivierten Th-Zellen exprimiert wird. In der Milz von mit *T. gondii* infizierten Mäusen waren TIM-3 exprimierende Th-Zellen gleichzeitig bevorzugt CD25⁺, CD44⁺, ICOS⁺, CD134⁺, CD154⁺ und CD62L⁻. Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Anteil TIM-3⁺ Th-Zellen unter den IEL und LPL des Dünndarms ist daher der allgemein höhere Anteil an Zellen mit einem aktivierten Phänotyp. Moleküle wie das TIM-3 Molekül, die eine oder mehrere Mucin-Domänen enthalten, wie beispielsweise MAdCAM-1 (engl.: mucosal addressin cell adhesion molecule-1), haben häufig eine Funktion bei der gewebspezifischen Migration (homing) (Van Klinken et al., 1995). TIM-3 könnte eine Funktion bei der Migration aktivierter Th-Zellen zum Ort der Entzündung bzw. der Immunantwort haben. Die Identifikation des Liganden von TIM-3 kann mehr Aufschluss darüber geben. Durch konventionelles Koppeln rekombinant hergestellten TIM-3 Fusionsproteins mit Fluorochromen und anschließender Untersuchung von Zellen am Durchflusszytometer gelang es hier nicht, Zellen zu identifizieren, die den Liganden von TIM-3 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Eine andere Möglichkeit, den Liganden zu identifizieren, ist die rekombinante Herstellung von Fluorochrom-gekoppelten TIM-3-Multimeren, die eine Verstärkung schwacher Bindungen ermöglicht. Eine bevorzugte Expression des Liganden auf bestimmten Zellen und in bestimmten Geweben würde für eine migratorische Funktion sprechen. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch dagegen. Im gesunden Tier ist der Anteil TIM-3 exprimierender T-Zellen in den IEL und LPL nur geringfügig höher als in den anderen untersuchten Geweben und Organen. Und nach einer oralen Infektion mit *T. gondii*, welche zu einer starken Entzündung des Darms führt, wurde in allen untersuchten Organen ein stark erhöhter Anteil TIM-3 exprimierender T-Zellen gemessen. Die TIM-3 Expression erhöhte und erniedrigte sich auf den T-Zellen der IEL und LPL des Dünndarms mit der gleichen Kinetik wie in der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und der Leber. Bei einer darmspezifischen Wanderung der TIM-3⁺ T-Zellen, wird ein anderes Expressionsmuster erwartet. Deshalb scheint TIM-3 nicht zu den Mucin-haltigen Molekülen mit migratorischen Funktionen zu gehören. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine mögliche migratorische Funktion auf posttranslationaler Ebene, beispielsweise über Glykosylierung, erfolgt. Bei MAdCAM-1 wird beispielsweise über die Glykosylierung der Mucin-Domäne die Ligandenbindung und dadurch die gewebespezifische Migration reguliert (Brandtzaeg et al., 1999). Deshalb muss der Glykosylierungszustand des TIM-3 Moleküls auf verschiedenen Zelltypen und in unterschiedlichen Geweben im Weiteren untersucht werden.

In drei Infektionsmodellen wurde erstmals der Einfluss unterschiedlicher Pathogene auf die TIM-3 Expression untersucht. Dabei konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass TIM-3 von Th-Zellen exprimiert wird, die einen aktivierten Phänotyp haben, determiniert anhand der Expression der „Aktivierungsmarker“ CD62L, CD44, CD25, CD134, CD154 und ICOS.

Einige dieser Oberflächenmoleküle, wie CD44 und CD62L werden bevorzugt von Gedächtniszellen exprimiert. Die deutliche negative Assoziation der Koexpression von TIM-3 und CD62L spricht eher dafür, dass die TIM-3 Expression wahrscheinlich mit einem aktivierten Th-Phänotyp und nicht mit Th-Gedächtniszellen assoziiert ist.

Die Expression von TIM-3 ist somit abhängig von Aktivierung. Das wurde *in vitro* nach antigenspezifischer Stimulation von Th-Linien und *in vivo* nach Infektion beobachtet. Es muss jedoch noch andere Faktoren geben, die für die Expression von TIM-3 verantwortlich sind, denn nur nach einer Infektion mit *T. gondii* erhöht sich die TIM-3 Expression auf den T-Zellen stark. In den anderen untersuchten Infektionsmodellen wurden geringe oder keine Effekte der Infektion auf die TIM-3 Expression der T-Zellen gemessen. Die gemessenen Änderungen in der TIM-3 Expression auf T-Zellen nach einer Infektion mit *L. monocytogenes*, die eine Th1-Antwort hervorruft, oder mit *N. brasiliensis*, die zu einer Th2-Antwort führt, waren nicht vergleichbar mit dem nach einer *T. gondii*-Infektion beobachteten Effekt. Ein möglicher Grund könnte die Natur des Pathogens sein. *T. gondii* ist ein intrazelluläres Protozoon. Infektionen mit einzelligen Pathogenen werden durch komplexe und meist antigenisch unterschiedliche Stadien des Lebenszyklus in ihrem entsprechenden Wirt charakterisiert. Listerien dringen in das Zytosol ein und die Infektion ähnelt mehr einer viralen als einer bakteriellen Infektion. *L. monocytogenes* und *N. brasiliensis* werden außerdem nach der Infektion vom Organismus eliminiert und ausgestoßen. Die Infektion mit dem verwendeten *T. gondii* Stamm ME49 führt dagegen zu einer chronischen Infektion (Suzuki and Remington, 1988). Durch Untersuchungen von weniger chronischen Infektionen mit anderen *T. gondii*-Stämmen und Infektionen mit anderen Protozoen, wie beispielsweise Leishmanien kann überprüft werden, ob eine verstärkte TIM-3 Expression charakteristisch für Infektionen mit Protozoen ist oder allgemeiner für chronische Immunantworten.

5.2 Assoziation der TIM-3 Expression mit einem Th1-Phänotyp

Eine Reihe von Oberflächenmolekülen ist bislang beschrieben worden, um Th1- von Th2-Zellen zu unterscheiden. So exprimieren Th1-Zellen beispielsweise beide Untereinheiten des IL-12R ($\beta 1$ und $\beta 2$), während Th2-Zellen lediglich den IL12R $\beta 1$ besitzen (Rogge et al., 1997; Rogge et al., 1999; Szabo et al., 1997; Szabo et al., 1995). Auf der anderen Seite weisen Th2-Zellen beide Ketten des IFN- γ R (α und β) auf, während Th1-Zellen nur IFN- γ R α exprimieren (Groux et al., 1997; Pernis et al., 1995). Die Expression des IL-18R scheint ebenfalls mit Th1-Zellen assoziiert zu sein (Chan et al., 2001; Xu et al., 1998b), es gibt jedoch widersprüchliche Befunde. So kann eine TZR-vermittelte Stimulation in Anwesenheit von IL-18 zur Differenzierung von Th2-Zellen führen (Xu et al., 2000; Yoshimoto et al., 2000). Weitere Oberflächenmoleküle wie 4-1BB (CD137), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie und CD94/NKG2 scheinen ebenfalls mit einem Th1-Phänotyp in Verbindung zu stehen (Kim

et al., 1998; Meyers et al., 2002). Diese Befunde sind jedoch bislang noch nicht von anderen bestätigt worden.

Das bereits erwähnte T1/ST2 Molekül wird dagegen nur von Th2-Zellen und nicht von Th1-Zellen exprimiert (Kropf et al., 1999; Löhning et al., 1999; Löhning et al., 1998; Xu et al., 1998a). Einigen Berichten zufolge steht auch die Expression von ICOS in Verbindung mit Th2-Zellen. Es konnte durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass Th2-Zellen mehr ICOS exprimieren als Th1-Zellen, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Coyle et al., 2000; Gonzalo et al., 2001; McAdam et al., 2000). Ferner besitzen ICOS defiziente Mäuse eine verminderte Fähigkeit für die Produktion von IL-4, IL-10 und IL-13 aber nicht von IFN- γ (Dong et al., 2001; Tafuri et al., 2001). Es konnte andererseits gezeigt werden, dass ICOS auch an der Entstehung von Th1-Zellen beteiligt sein und von IFN- γ produzierenden CD4⁺ Th-Zellen exprimiert werden kann (Bonhagen et al., 2003; Ozkaynak et al., 2001; Rottman et al., 2001; Yoshinaga et al., 1999). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass ICOS abhängig von Faktoren wie der Natur des Antigens und der Lokalisierung und Dauer der Immunantwort bei verschiedenen Immunantworten an der Kostimulation unterschiedlicher Effektorfunktionen beteiligt sein kann (Bonhagen et al., 2003).

Eine Reihe von Chemokinrezeptoren wurde ebenfalls als spezifisch von Th1- bzw. Th2-Zellen gebildet beschrieben. Es wurde gezeigt, dass *in vitro* differenzierte humane und murine Th1-Zellen CCR-5 (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998), CXCR-3 (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998), CCR-1 (Bonecchi et al., 1998; Gao et al., 2000; Sallusto et al., 1998) und in der Maus zusätzlich CCR-7 (Randolph et al., 1999) exprimieren. Th2-Zellen bilden dagegen CCR-3 (Gerber et al., 1997; Sallusto et al., 1997), CCR-4 (Bonecchi et al., 1998; D'Ambrosio et al., 1998; Imai et al., 1999; Sallusto et al., 1998), CCR-8 (D'Ambrosio et al., 1998; Zingoni et al., 1998) und CXCR-4 (Jourdan et al., 1998). Es gibt jedoch einige Kontroversen in Bezug auf die Expression von CCR-7, CXCR-3 und CCR-5 auf Th1- sowie von CCR-3 und CXCR-4 auf Th2-Zellen. CCR-5 und CXCR-3 werden in geringerer Menge auch von Th2-Zellen exprimiert (Sallusto et al., 1998; Sallusto et al., 2000), während CCR-4 auch von Th0-Zellen und aktivierten Th1-Zellen gebildet werden kann (D'Ambrosio et al., 1998; Romagnani et al., 2000). Eine CCR-7⁺ Th-Subpopulation wurde beim Menschen als zentrale Gedächtniszellen (engl.: central memory T cell, T_{CM}) identifiziert, die zu Lymphknoten migrieren und dendritische Zellen stimulieren, um neue Effektorzellen zu generieren (Sallusto et al., 1999). Naive T-Zellen exprimieren ebenfalls CCR-7, um zu Lymphknoten zu migrieren (Moser and Loetscher, 2001).

Die unterschiedliche Expression auf Th1- und Th2-Zellen der meisten dieser Moleküle ist somit von quantitativer Natur und nicht spezifisch für eine bestimmte Subpopulation. Zur Identifikation von Th2-Zellen existiert bislang lediglich ein zuverlässiges Markermolekül, T1/ST2 (Löhning et al., 1998; Neurath et al., 2002; Xu et al., 1998a). Für Th1-Zellen

spezifische Oberflächenmoleküle wie IL12R β 2 konnten aus Mangel an geeigneten Antikörpern bislang nur mit Northern Blots auf mRNA- und nicht auf Proteinebene untersucht werden. Für eine funktionale Untersuchung der Th1-Zellen ist jedoch ihre Identifizierung als intakte und lebende Zelle auf Einzelzellebene anhand von Oberflächenmolekülen wünschenswert. Für IL12R β 2 gibt es bislang nur Antikörper im humanen System (Rogge et al., 1999). Andere bislang publizierte Th1-Markermoleküle konnten, wie oben erwähnt, noch nicht eindeutig bestätigt werden. So wurde auch TIM-3 als spezifisch von Th1-Zellen und nicht von Th2-Zellen exprimiert beschrieben (Monney et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch erstmals die Koexpression von TIM-3 auf der Oberfläche mit intrazellulären Zytokinen auf Einzelzellebene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Th-Zellen, die TIM-3 auf ihrer Oberfläche exprimieren, in der Lage sind, das Th2-Zytokin IL-4 zu produzieren. TIM-3 exprimierende Th-Zellen zeigten keine Tendenz, IFN- γ bevorzugt stärker oder IL-4 bevorzugt weniger zu produzieren. Th1-Zellen produzieren aber per Definition kein IL-4 (Mosmann and Coffman, 1989). Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Th-Zellen, die TIM-3⁺ sind, ebenfalls das Th2-Molekül T1/ST2 auf ihrer Oberfläche exprimieren können. Somit können Aussagen über eine exklusive Expression von TIM-3 auf Th1-Zellen nicht getroffen werden. Die Analyse der Th1- und Th2-Linien zeigt aber eine deutlich bevorzugte, wenn auch nicht ausschließliche, Expression von TIM-3 unter Th1 polarisierenden Bedingungen. Außerdem korreliert bei der Infektion mit *T. gondii* die TIM-3 Expression mit der IFN- γ Produktion. Somit ist die TIM-3 Expression nur unter bestimmten Bedingungen mit einem Th1-Phänotyp assoziiert. Die Beantwortung dieser Frage ist von kritischer Bedeutung und könnte endgültig durch die Analyse der Koexpression von TIM-3 mit den Th1-/ Th2-spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet respektive GATA-3 geklärt werden.

Die Th1- und Th2-Dichotomie ist zu einem zentralen Bestandteil für das Verständnis der Regulierung von Immunantworten geworden und dient der Beschreibung von immunologischen Prozessen bei Allergien und verschiedenen Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen. Sie stellt jedoch ein stark vereinfachtes Konzept dar. Gerade bei Th1-Zellen scheint es eine Vielzahl unterschiedlicher möglicher Aktivierungswege zu geben. Kofaktoren wie IL-18, IL-23 und IL-27 können eine IL-12 induzierte Th1-Antwort verstärken. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wird TIM-3 nicht ausschließlich spezifisch von Th1-Zellen exprimiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den Infektionsmodellen mit *T. gondii* und *L. monocytogenes* machen deutlich, dass nicht jede Infektion, die eine Th1-Antwort hervorruft, zu einer gesteigerten TIM-3 Expression auf T-Zellen führt. Weitere Faktoren, die wahrscheinlich in verschiedenem Maß von unterschiedlichen Pathogenen hervorgerufen werden, sind vermutlich an der Induktion der TIM-3 Expression beteiligt. So könnte die TIM-3 Expression von einem der bisher bekannten

Th1-Kofaktoren abhängen. Das wäre *in vitro* durch die Untersuchung der TIM-3 Expression auf Th1-Linien von Mäusen, die defizient für IL-18, IL-23 oder IL-27 sind und durch den Vergleich mit Th1-Linien aus wildtyp Tieren möglich. Außerdem kann die TIM-3 Expression auf T-Zellen nach einer Infektion mit *T. gondii* in wildtyp Mäusen *ex vivo* mit der in IL-18, IL-23 oder IL-27 defizienten Mäusen verglichen werden. Die Expression von TIM-3 könnte unter Th1 polarisierenden Bedingungen durch einen IL-12 Kofaktor verstärkt induziert werden, der nur unter bestimmten Bedingungen von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird.

5.3 Immunologische Funktion der TIM-3 Expression

Zu Beginn dieser Arbeit gab es bis auf den Befund der Kooperationspartner bei der Firma Millennium, dass TIM-3 auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Th2-Zellen verstärkt von Th1-Zellen exprimiert wird, keine weiteren Informationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb mehrere mögliche Funktionen überprüft.

Der Vergleich TIM-3 defizienter Mäuse mit ihren wildtyp Geschwistern zeigte, dass eine fehlende TIM-3 Expression keinen Einfluss auf die thymische T-Zell-Reifung und die Verteilung von naiven oder Gedächtnis-Th-Zellen in der Milz hat. Sie führt auch nicht zu Änderungen in der Verteilung und der Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, von B-Zellen, dendritischen Zellen oder Makrophagen in der Milz, den Lymphknoten, dem Thymus, dem Knochenmark und im Blut.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression von TIM-3 keinen essentiellen Einfluss auf die Entwicklung und die Homöostase der untersuchten Zellpopulationen hat.

TIM-3 scheint ebenfalls keine entscheidende Rolle bei der Differenzierung naiver Th-Zellen zu spielen. In einem *in vitro*-System konnte gezeigt werden, dass das Kreuzvernetzen mit anti-TIM-3 bzw. das Blockieren mit löslichem anti-TIM-3 oder rekombinantem TIM-3 Fusionsprotein keinen Effekt auf die Differenzierung von naiven Th-Zellen unter Th0-, Th1- oder Th2-Bedingungen hat. Ferner differenzieren Splenozyten aus TIM-3 defizienten Mäusen wie ihre wildtyp Kontrollen unter Th0-, Th1- und Th2-Bedingungen und zeigen vergleichbare Anteile IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-2, TNF- α und IL-5 produzierender Th-Zellen. In diesen Untersuchungen wurden die Th-Zellen polykonal und unspezifisch mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern aktiviert. Unter diesen Bedingungen hat die fehlende TIM-3 Expression keinen Einfluss auf das Zytokinexpressionsmuster und somit auf den Phänotyp der sich differenzierenden Th-Zellen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Wechselwirkung mit APZ wichtig für die Funktion des TIM-3 Moleküls ist. Deshalb wurde begonnen, TIM-3 defiziente Mäuse mit DO11.10 Mäusen zu kreuzen, um Mäuse zu erhalten, denen die TIM-3 Expression fehlt und deren T-Zellen einen transgenen OVA-spezifischen TZR exprimieren. Diese Zellen können antigenspezifisch über ihren TZR aktiviert werden

und ihre Differenzierung mit der von TIM-3 exprimierenden DO11.10 Th-Zellen der wildtyp Geschwister verglichen werden. Dadurch kann endgültig geklärt werden, ob die Expression von TIM-3 eine essentielle Funktion bei der Differenzierung von Th-Zellen hat.

Ferner konnte gezeigt werden, dass immunisierte TIM-3 defiziente Mäuse zu wildtyp Mäusen vergleichbare Titer antigenspezifischer Immunglobuline im Serum aufweisen. Der Klassenwechsel der antigenspezifischen Immunglobuline wird ebenso durch die Abwesenheit der TIM-3 Expression nicht beeinflusst und war bei den wildtyp Kontrollen vergleichbar. Somit scheint die Expression von TIM-3 keinen entscheidenden Einfluss auf humorale Immunantworten zu haben. Ein Einfluss der TIM-3 Expression auf die T-Zell-Apoptose wurde ebenfalls ausgeschlossen.

5.4 Perspektiven

Im Zeitraum der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde TIM-3 erstmals in der Literatur erwähnt. Über den Vergleich Asthma resistenter DBA/2 Mäuse mit suszeptiblen BALB/c Mäusen, wurde eine Region auf Maus Chromosom 11 identifiziert, *Tapr* (engl.: T cell and airway phenotype regulator), welche die Suszeptibilität für die beobachtete Th2-Zytokinproduktion und AHR (engl.: airway hypersensitivity reaction) vermittelt (McIntire et al., 2001). Innerhalb der *Tapr* Region wurde über positionelle Klonierung eine neue Genfamilie, die *tim*-Familie, entdeckt, welche für membranständige T-Zell-Glykoproteine kodiert. Zu dieser Familie gehören TIM-1, TIM-2 und TIM-3. Das Homolog von TIM-1 in Ratten heisst KIM-1 (engl.: kidney injury molecule-1) (Ichimura et al., 1998). Polymorphismen in TIM-1 und TIM-3 sollen mit der Th1-/ Th2-Differenzierung und dem Ausbruch von AHR in kongenen Mäusen in Verbindung stehen (McIntire et al., 2001). Das humane Homolog für TIM-1 ist der zelluläre Rezeptor für den Hepatitis A Virus (HAVcr-1). Entfernte Verwandtschaft von rKIM-1, also mTIM-1, besteht unter anderem zu den TREM (engl.: triggering receptor expressed on myeloid cells) Molekülen.

Bislang wurden fünf *Trem*-Gene identifiziert, von denen vier für potentiell funktionale Typ I Transmembran Glykoproteine kodieren (Chung et al., 2002). Die *Trem*-Gene sind auf Maus Chromosom 17 bzw. dem humanen Chromosom 6 geclustert. TREMs besitzen eine einzelne extrazelluläre Ig-Domäne. Bei der Signaltransduktion assoziieren alle bekannten TREMs mit KARAP/ DAP12 Adapterproteinen (Bouchon et al., 2000; Bouchon et al., 2001; Chung et al., 2002; Daws et al., 2001). Aufgrund ihrer Struktur besteht eine entfernte Homologie zu TIM-3 (Daws et al., 2001). Alle *tim*-Familienmitglieder (Kim-1, Tim-2 und Tim-3) liegen aber auf dem humanen Chromosom 5q33.2 und dem Maus Chromosom 11 (Monney et al., 2002).

Laut einer Hypothese reguliert eine Superfamilie von Rezeptoren mit einzelner extrazellulärer Ig-Domäne Zellen des angeborenen Immunsystems (Daws et al., 2001). Viele Proteine, die an der Antigen-Erkennung und an Zell-Zell-Kontakten im Immunsystem beteiligt

sind, enthalten Ig-Domänen. Bei Adhäsionsproteinen werden diese Ig-Domänen spezifisch von Integrinen erkannt. Mitglieder der Integrin-Familie vermitteln die feste Adhäsion zwischen Zellen untereinander oder Zellen und extrazellulärer Matrix. Es bleibt zu klären, ob TIM-3 zu dieser Superfamilie von Rezeptoren mit einzelner extrazellulärer Ig-Domäne gehört und diese Hypothese auf TIM-3 zutrifft. Daher muss untersucht werden, ob Signale von TIM-3 auch über das Adaptermolekül DAP12 vermittelt werden.

Neben der Ig-Domäne enthält das TIM-3 Molekül eine Mucin-Domäne. Mucine sind gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an Serin-, Threonin- und Prolin-Resten sowie O-verknüpfte Glykosylierung der Serin- und Threonin-Reste (Van Klinken et al., 1995). Mucine werden in zwei Klassen eingeteilt, basierend auf dem Zelltyp, von dem sie exprimiert werden. Zu den epithelialen Mucinen gehören MUC-1 bis MUC-8 und zu den leukozytären/ endothelialen Mucinen werden humanes CD34, humanes CD43, humanes CD45RA, GlyCAM-1 (engl.: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), MAdCAM-1, CD96 (TACTILE), CD162 (P-Selektin Glykoprotein Ligand, PSGL-1) sowie die kürzlich entdeckten KIM-1, PCLP, endomucin, CD42b α , CD68 und CD107 gezählt (Watt et al., 2000). TIM-3 wird aufgrund seiner Homologie zu KIM-1 somit zu den leukozytären/ endothelialen Mucinen gezählt. Vier weitere Mitglieder der leukozytären/ endothelialen Mucine enthalten eine oder mehrere Ig-Domänen, nämlich GlyCAM-1, MAdCAM-1, CD34 und CD96 (Van Klinken et al., 1995). Diese Mucine sind Adhäsionsmoleküle, die an der Migration und Aktivierung von Lymphozyten beteiligt oder Teil der Aktivierungskaskade sind, welche eine Rolle bei der Entstehung von Entzündungen hat. Bei MAdCAM-1 spielt, wie bereits erwähnt, der Glykosylierungszustand seiner Mucin-Domäne eine Rolle für die Ligandenbindung und deren Funktion (Brandtzaeg et al., 1999). CD34 und GlyCAM-1 werden in den Lymphknoten auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel und MAdCAM-1 wird auf Venolen mit hohem Endothel im lymphatischen Schleimhautgewebe exprimiert. CD96 wird von NK-Zellen und T-Lymphozyten exprimiert und seine Expression wird einige Tage nach der Aktivierung dieser Zelltypen stark heraufreguliert. Es wird auf peripheren B-Zellen nicht detektiert, ist jedoch auf aktivierten B-Zellen in geringen Mengen zu finden (Wang et al., 1992). TIM-3 wird von aktivierten T-Lymphozyten sowie von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Die Rolle der TIM-3 Expression für Zell-Zell-Adhäsionen muss im Weiteren untersucht werden. Insbesondere der Glykosylierungszustand von TIM-3, das auf verschiedenen Zelltypen und in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird, kann mehr Aufschluss über eine mögliche Funktion der Expression dieses Moleküls geben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des bislang unbekannten Oberflächenmoleküls TIM-3 erstmals genauer untersucht. Die spezifische Expression von TIM-3 durch Th1-Zellen kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass TIM-3 nicht nur von Th-

Zellen, sondern auch von CD8⁺ T-Zellen, γ/δ -T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Das TIM-3 Molekül wird somit von Zellen des angeborenen sowie des erworbenen Teils des Immunsystems exprimiert. Aufgrund dieses Expressionsprofils könnte TIM-3 an der Kommunikation zwischen angeborener und erworbener Immunität beteiligt sein. In der bislang einzigen publizierten Untersuchung über TIM-3 wird ein potenzieller supprimierender Einfluss von TIM-3 auf Makrophagen postuliert (Monney et al., 2002). Für Th-Zellen besteht eine Präferenz der TIM-3 Expression auf Th1-Zellen.

Die genaue Funktion der TIM-3 Expression auf Th-Zellen konnte nicht geklärt werden. Außerdem ist die Frage offen, welche Faktoren für die Expression von TIM-3 erforderlich sind bzw. wodurch die Expression verhindert werden kann. Interessante Kandidaten sind Zytokine wie IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 als möglicherweise TIM-3 induzierende Faktoren, sowie als eventuell unterdrückende Faktoren TGF- β , IL-10, IL-4 und IL-13. Es bleibt zu untersuchen, ob die TIM-3 Expression von einem der bisher bekannten Th1-Induktionsfaktoren abhängt. Dadurch kann vielleicht mehr Aufschluss über die Bedingungen, welche für die TIM-3 Expression *in vivo* verantwortlich sind, gewonnen werden.

Erst wenn genauere Informationen über die Prozesse, welche für die Induktion der TIM-3 Expression auf Th-Zellen verantwortlich sind, vorliegen, wird vermutlich deren Rolle bei Immunantworten deutlicher werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TIM-3 keinen essentiellen Einfluss auf die Differenzierung naiver Th-Zellen hat. TIM-3 scheint eher eine Rolle bei Prozessen zu spielen, die nach der Aktivierung naiver Th-Zellen erfolgen. Aufgrund der Proteinstruktur des TIM-3 Moleküls mit seinen Mucin- und Ig-Domänen wäre eine Rolle bei der Migration und/ oder der Zell-Zell-Adhäsion denkbar. Es konnte keine bevorzugte Expression von TIM-3 in einem bestimmten Organ oder Gewebe in gesunden Tieren oder nach Infektion festgestellt werden. Wahrscheinlicher ist daher eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen insbesondere aktivierter T-Zellen, die noch weiter aufgeklärt werden muss.

Deshalb ist die genauere Untersuchung der TIM-3 Expression auf Zellen des angeborenen Immunsystems, den Makrophagen und vor allen Dingen den dendritischen Zellen von Interesse. Dabei ist eine wichtige Frage, ob die Expression von TIM-3 auf bestimmte Subpopulationen dieser Zellen in bestimmten Geweben eingegrenzt werden kann. Von entscheidender Bedeutung bleibt auch die Identifizierung des Liganden von TIM-3.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals die Expression des TIM-3 Proteins auf Zellen des Immunsystems und insbesondere T-Zellen systematisch untersucht, und es konnte eine bevorzugte, jedoch nicht spezifische, Expression auf aktivierten Th1-Zellen belegt werden.

Zusammenfassung

TIM-3 wurde auf der Suche nach differenziell von murinen Th1- und Th2-Zellen exprimierten Genen gefunden. Dabei wurde gezeigt, dass mRNA für das Oberflächenmolekül TIM-3 stärker von aktivierten Th1-Zellen gebildet wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass TIM-3 nicht nur von CD4⁺ Th-Zellen, sondern auch von CD8⁺ T-Zellen, γ/δ -T-Zellen, sowie einigen Makrophagen und der Mehrheit der dendritischen Zellen in der Milz von Mäusen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Expression von TIM-3 auf Th-Zellen ist klar mit einem aktivierten Phänotyp assoziiert. Nach Infektion wurde nur in dem Modell mit dem Protozoon *T. gondii*, nicht mit dem Bakterium *L. monocytogenes* und nicht mit dem Nematoden *N. brasiliensis*, eine starke Erhöhung der TIM-3 Expression auf Th-Zellen und CD8⁺ T-Zellen beobachtet.

TIM-3 wird unter polarisierenden Bedingungen *in vitro* im Vergleich zu Th2-Zellen bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich von Th1-Zellen exprimiert. Erstmals wurde auf Einzelzelebene die Zytokinproduktion TIM-3 exprimierender Th-Zellen untersucht. Die Analyse von Th0-Zellen, welche unter nichtpolarisierenden Bedingungen *in vitro* hergestellt wurden, ergab keine bevorzugte Produktion von Th1-Zytokinen und keine verminderte Expression von Th2-Zytokinen. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse erlaubt die Expression von TIM-3 allein daher nicht die Identifizierung von Th1-Zellen. Nach einer Infektion mit *T. gondii* lag jedoch eine bevorzugte Assoziation zwischen der Expression von TIM-3 und der pathogenspezifischen Produktion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α vor. Somit korreliert die TIM-3 Expression auf Th-Zellen nur unter bestimmten Bedingungen mit einem Th1-Phänotyp.

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit systematisch mehrere mögliche immunologische Funktionen der TIM-3 Expression auf Th-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von TIM-3 keinen entscheidenden Einfluss auf die Antikörperantwort und den Klassenwechsel nach einer Immunisierung und auf die T-Zell-Apoptose hat. Die TIM-3 Expression ist außerdem nicht essentiell für die thymische Reifung der T-Zellen und ihre Differenzierung. Ferner hat die Expression von TIM-3 keinen Einfluss auf die Anzahl und die Organverteilung von T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen in der gesunden Maus. Für einige in Frage kommende Funktionen der TIM-3 Expression auf Th-Zellen kann also aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine essentielle Bedeutung ausgeschlossen werden. Die genaue Funktion muss in weiteren Analysen nachgewiesen werden.

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AHR	engl.: airway hypersensitivity reaction
mAk	monoklonaler Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bio	Biotin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
CD	Definierte Oberflächenantigene auf Immunzellen (engl.: cluster of differentiation)
CFA	komplettes Freund's Adjuvans (engl.: complete Freund's adjuvans)
cm	Zentimeter (engl.: centimeter)
CTLA-4	engl.: cytotoxic T lymphocyte antigen-4
Cy5	Indodicarbocyanin 5
Da	Dalton (arbiträre Einheit für $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
DAG	Diacylglycerin
DH-Stelle	DNase I hypersensitive Stelle
DD	Dünndarm
Dig	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DMEM	engl.: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
DTH	engl.: delayed hypersensitivity reaction
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	engl.: enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Etn	engl.: early transposable element
FACS®	durchflusszytometrische Zellsortierung (engl.: fluorescence associated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FL	Fluoreszenz
FSC	engl.: forward scatter
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (engl.: gravity)
GlyCAM-1	engl.: glycosylation dependent cell adhesion molecule-1
GM-CSF	engl.: granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
GPI	Glucose-6-Phosphatisomerase
h	Stunde (lat.: hora)
HAVcr-1	zellulärer Rezeptor für den Hepatitis A Virus
HRP	engl.: horse radish peroxidase
HAS	engl.: heat stable antigen
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
ICOS	engl.: Inducible costimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
IUPAC	engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry
KIM-1	engl.: kidney injury molecule-1
KM	Kulturmedium
ko	engl.: knockout
L	Ligand
LLO	Listeriolysin
LN	Lymphknoten
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
lpr	engl.: lymphoproliferation
MACS®	magnetische Zellsortierung (engl.: magnetic cell sorting)
MAdCAM-1	engl.: mucosal addressin cell adhesion molecule-1
mesLN/mLN	mesenteriale Lymphknoten
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex (engl.: major histocompatibility complex)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
Min.	Minute
mM	Millimolar
MPI-IB	Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie

mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killer(zelle)
nm	Nanometer
NMS	Normales Mäuseserum
O.D.	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	engl.: pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
pg	Pikogramm
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PO	Peroxidase
<i>p.o.</i>	oral
PP	Peyer'sche Plaques
PRR	engl.: pattern recognition receptor
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG	engl.: recombinase activating gene
rlgG	Ratten Immunglobulin G
rpm	Umdrehungen/Minute (engl.: rounds per minute)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
<i>s.c.</i>	subkutan
<i>S.D.</i>	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SEB	engl.: staphylococcal enterotoxin B
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SPF	engl.: specific pathogen free
SI	Stimulationsindex

SSC	engl.: side scatter
STAT	engl.: signal transducer and activator of transcription
TAP	engl.: transporters associated with antigen processing
T _{CM}	engl.: central memory T cell
TCCR	engl.: T cell cytokine receptor
T _{FH}	engl.: follicular B helper T cell
tg	transgen
TGF	engl.: transforming growth factor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIM-3	engl.: T cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule-3
TLA	<i>Toxoplasma gondii</i> Lysat Antigen
TLR	engl.: Toll like receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindihydrochlorid
TREM	engl.: triggering receptor expressed on myeloid cells
TZR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Ts	T-Suppressorzelle
U	(Enzym-) Einheit (engl.: Unit)
UV	Ultraviolett
VF	Verdünnungsfaktor
v/v	Volumen/Volumen (engl.: volume per volume)
WM	Waschmedium
w/v	Gewicht/Volumen (engl.: weight per volume)
ZTL	Zytotoxische/-lytische T-Zelle

Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R., and Nagata, S. (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1756-1760.
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557.
- Agarwal, S., Avni, O., and Rao, A. (2000). Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity* 12, 643-652.
- Agarwal, S., and Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9, 765-775.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60.
- Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85, 85-95.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.
- Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F., and Kopf, M. (1998). Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol* 8, 669-672.
- Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C. R., and Reiner, S. L. (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9, 229-237.
- Bishop, Y. M. M., Fienberg, S. E., and Holland, P. W. (1975). In *Discrete Multivariate Analysis: Theory and Practice*. (MIT Press, Cambridge, MA).
- Bjorkman, P. J. (1997). MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 89, 167-170.
- Bluestone, J. A., Khattri, R., Sciammas, R., and Sperling, A. I. (1995). TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 307-353.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordinon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134.
- Bonhagen, K., Liesenfeld, O., Stadecker, M. J., Hutloff, A., Erb, K., Coyle, A. J., Lipp, M., Kroczeck, R. A., and Kamradt, T. (2003). ICOS⁺ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur J Immunol* 33, 392-401.
- Bonhagen, K., Thoma, S., Bland, P., Bregenholt, S., Rudolphi, A., Claesson, M. H., and Reimann, J. (1996). Cytotoxic reactivity of gut lamina propria CD4⁺ alpha beta T cells in SCID mice with colitis. *Eur J Immunol* 26, 3074-3083.

- Bouchon, A., Dietrich, J., and Colonna, M. (2000). Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* **164**, 4991-4995.
- Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M., and Colonna, M. (2001). A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* **194**, 1111-1122.
- Brandtzaeg, P., Farstad, I. N., and Haraldsen, G. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today* **20**, 267-277.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* **192**, 1545-1552.
- Brunt, L. M., Portnoy, D. A., and Unanue, E. R. (1990). Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J Immunol* **145**, 3540-3546.
- Budd, R. C., Cerottini, J. C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, T., Howe, R. C., and MacDonald, H. R. (1987). Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J Immunol* **138**, 3120-3129.
- Busch, D. H., Bouwer, H. G., Hinrichs, D., and Pamer, E. G. (1997). A nonamer peptide derived from *Listeria monocytogenes* metalloprotease is presented to cytolytic T lymphocytes. *Infect Immun* **65**, 5326-5329.
- Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijn, S., and Pamer, E. G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8**, 353-362.
- Chan, W. L., Pejnovic, N., Lee, C. A., and Al-Ali, N. A. (2001). Human IL-18 receptor and ST2L are stable and selective markers for the respective type 1 and type 2 circulating lymphocytes. *J Immunol* **167**, 1238-1244.
- Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S., and de Sauvage, F. J. (2000). Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* **407**, 916-920.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-1240.
- Chiaromonte, M. G., Schopf, L. R., Neben, T. Y., Cheever, A. W., Donaldson, D. D., and Wynn, T. A. (1999). IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol* **162**, 920-930.
- Chung, D. H., Seaman, W. E., and Daws, M. R. (2002). Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur J Immunol* **32**, 59-66.
- Colwell, D. A., and Wescott, R. B. (1973). Prolongation of egg production of *Nippostrongylus brasiliensis* in mice concurrently infected with *Nematospiroides dubius*. *J Parasitol* **59**, 216.
- Constant, S. L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* **15**, 297-322.
- Coyle, A. J., and Gutierrez-Ramos, J. C. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* **2**, 203-209.
- Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., *et al.* (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* **13**, 95-105.

- Coyle, A. J., Lloyd, C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., *et al.* (1999). Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* 190, 895-902.
- D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 161, 5111-5115.
- Daws, M. R., Lanier, L. L., Seaman, W. E., and Ryan, J. C. (2001). Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* 31, 783-791.
- Denkers, E. Y., and Gazzinelli, R. T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11, 569-588.
- Dolhain, R. J., van der Heiden, A. N., ter Haar, N. T., Breedveld, F. C., and Miltenburg, A. M. (1996). Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 1961-1969.
- Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H., and Flavell, R. A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97-101.
- Drappa, J., Brot, N., and Elkon, K. B. (1993). The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10340-10344.
- Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16, 201-223.
- Egen, J. G., Kuhns, M. S., and Allison, J. P. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3, 611-618.
- Ferber, I. A., Lee, H. J., Zonin, F., Heath, V., Mui, A., Arai, N., and O'Garra, A. (1999). GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol* 91, 134-144.
- Finkelman, F. D., Morris, S. C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, S. L., Reilly, N. L., Schopf, L., and Urban, J. F., Jr. (2000). Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164, 2303-2310.
- Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C. A., Morris, S. C., Madden, K. B., Gause, W. C., and Urban, J. F., Jr. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol* 15, 505-533.
- Finkelman, F. D., Wynn, T. A., Donaldson, D. D., and Urban, J. F. (1999). The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol* 11, 420-426.
- Firestein, G. S., Roeder, W. D., Laxer, J. A., Townsend, K. S., Weaver, C. T., Hom, J. T., Linton, J., Torbett, B. E., and Glasebrook, A. L. (1989). A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 143, 518-525.
- Foy, T. M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J. E., and Noelle, R. J. (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 14, 591-617.
- Gao, W., Topham, P. S., King, J. A., Smiley, S. T., Csizmadia, V., Lu, B., Gerard, C. J., and Hancock, W. W. (2000). Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 105, 35-44.

- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149, 175-180.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146, 286-292.
- Geginat, G., Schenk, S., Skoberne, M., Goebel, W., and Hof, H. (2001). A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 166, 1877-1884.
- Gerber, B. O., Zanni, M. P., Uguccioni, M., Loetscher, M., Mackay, C. R., Pichler, W. J., Yawalkar, N., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol* 7, 836-843.
- Gonzalo, J. A., Tian, J., Delaney, T., Corcoran, J., Rottman, J. B., Lora, J., Al-garawi, A., Kroczeck, R., Gutierrez-Ramos, J. C., and Coyle, A. J. (2001). ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol* 2, 597-604.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A. A., Mages, H. W., *et al.* (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4, 261-268.
- Grogan, J. L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D. A., Sedat, J. W., and Locksley, R. M. (2001). Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 14, 205-215.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Guler, M. L., Gorham, J. D., Hsieh, C. S., Mackey, A. J., Steen, R. G., Dietrich, W. F., and Murphy, K. M. (1996). Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. *Science* 271, 984-987.
- Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., and Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 173, 471-481.
- Guy-Grand, D., and Vassalli, P. (1993). Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5, 247-252.
- Havell, E. A., Beretich, G. R., Jr., and Carter, P. B. (1999). The mucosal phase of *Listeria* infection. *Immunobiology* 201, 164-177.
- Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W., and Glimcher, L. H. (1996). The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85, 973-983.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L., and Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273, 4135-4142.

- Igarashi, O., Yamane, H., Imajoh-Ohmi, S., and Nariuchi, H. (1998). IL-12 receptor (IL-12R) expression and accumulation of IL-12R beta 1 and IL-12R beta 2 mRNAs in CD4⁺ T cells by costimulation with B7-2 molecules. *J Immunol* **160**, 1638-1646.
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima, K., and Yoshie, O. (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* **11**, 81-88.
- Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* **165**, 6107-6115.
- Janeway, C. A., and Travers, P. (1997). *Immunologie*, 2. Auflage, Spektrumverlag).
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W. E., and Sher, A. (2000). Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4⁺ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* **164**, 3047-3055.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Ward, J. M., Cheever, A. W., Paul, W. E., and Sher, A. (1999). Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *J Immunol* **163**, 337-342.
- Jourdan, P., Abbal, C., Noraz, N., Hori, T., Uchiyama, T., Vendrell, J. P., Bousquet, J., Taylor, N., Pene, J., Yssel, H., and Nora, N. (1998). IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol* **160**, 4153-4157.
- Jung, T. M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., and Dailey, M. O. (1988). Down-regulation of homing receptors after T cell activation. *J Immunol* **141**, 4110-4117.
- Kamogawa, Y., Minasi, L. A., Carding, S. R., Bottomly, K., and Flavell, R. A. (1993). The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* **75**, 985-995.
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., and Grusby, M. J. (1996a). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* **4**, 313-319.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., and Grusby, M. J. (1996b). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**, 174-177.
- Katona, I. M., Urban, J. F., Jr., and Finkelman, F. D. (1988). The role of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol* **140**, 3206-3211.
- Kaufmann, S. H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**, 129-163.
- Kaufmann, S. H., and Ladel, C. H. (1994). Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Immunobiology* **191**, 509-519.
- Kawabe, Y., and Ochi, A. (1990). Selective anergy of V beta 8⁺, CD4⁺ T cells in *Staphylococcus enterotoxin B*-primed mice. *J Exp Med* **172**, 1065-1070.
- Kawabe, Y., and Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* **349**, 245-248.
- Kelso, A., and Gough, N. M. (1988). Coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, gamma interferon, and interleukins 3 and 4 is random in murine alloreactive T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9189-9193.
- Khan, I. A., Ely, K. H., and Kasper, L. H. (1994). Antigen-specific CD8⁺ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* **152**, 1856-1860.

- Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10, 745-751.
- Kim, Y. J., Kim, S. H., Mantel, P., and Kwon, B. S. (1998). Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur J Immunol* 28, 881-890.
- Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., Berg, E. L., and Butcher, E. C. (1989). Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245, 1238-1241.
- Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*, 7. Aufl., Thieme Verlag).
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248.
- Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811-822.
- Kropf, P., Schopf, L. R., Chung, C. L., Xu, D., Liew, F. Y., Sypek, J. P., and Muller, I. (1999). Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 29, 3621-3628.
- Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254, 707-710.
- Ladel, C. H., Flesch, I. E., Arnoldi, J., and Kaufmann, S. H. (1994). Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 153, 3116-3122.
- Lai, L., Alaverdi, N., Maltais, L., and Morse, H. C., 3rd (1998). Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol* 160, 3861-3868.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92-97.
- Lee, G. R., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* 14, 447-459.
- Lefrancois, L. (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 147, 1746-1751.
- Liesenfeld, O. (1999). Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* 201, 229-239.
- Liesenfeld, O., Kosek, J., Remington, J. S., and Suzuki, Y. (1996). Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184, 597-607.
- Liew, F. Y. (1989). Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. *Immunol Today* 10, 40-45.
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., and Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391, 344-345.
- Löhning, M., Grogan, J. L., Coyle, A. J., Yazdanbakhsh, M., Meisel, C., Gutierrez-Ramos, J. C., Radbruch, A., and Kamradt, T. (1999). T1/ST2 expression is enhanced on CD4+ T cells from schistosome egg-induced granulomas: analysis of Th cell cytokine coexpression ex vivo. *J Immunol* 162, 3882-3889.
- Löhning, M., Stroehmann, A., Coyle, A. J., Grogan, J. L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Levinson, D., Radbruch, A., and Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells,

independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6930-6935.

Lu, B., Yu, H., Chow, C., Li, B., Zheng, W., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2001). GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells. *Immunity* 14, 583-590.

MacDonald, H. R., Budd, R. C., and Cerottini, J. C. (1990). Pgp-1 (Ly 24) as a marker of murine memory T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 159, 97-109.

Mackay, C. R. (2000). Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm. *J Exp Med* 192, F31-34.

Magram, J., Connaughton, S. E., Warriar, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D. A., and Gately, M. K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4, 471-481.

Malek, T. R., Schmidt, J. A., and Shevach, E. M. (1985). The murine IL 2 receptor. III. Cellular requirements for the induction of IL 2 receptor expression on T cell subpopulations. *J Immunol* 134, 2405-2413.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 286, 1732-1735.

McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., *et al.* (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165, 5035-5040.

McIntire, J. J., Umetsu, S. E., Akbari, O., Potter, M., Kuchroo, V. K., Barsh, G. S., Freeman, G. J., Umetsu, D. T., and DeKruyff, R. H. (2001). Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2, 1109-1116.

McKenzie, G. J., Bancroft, A., Grecis, R. K., and McKenzie, A. N. (1998a). A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Curr Biol* 8, 339-342.

McKenzie, G. J., Emson, C. L., Bell, S. E., Anderson, S., Fallon, P., Zurawski, G., Murray, R., Grecis, R., and McKenzie, A. N. (1998b). Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 9, 423-432.

McLeod, R., Eisenhauer, P., Mack, D., Brown, C., Filice, G., and Spitalny, G. (1989). Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 142, 3247-3255.

McLeod, R., Estes, R. G., Mack, D. G., and Cohen, H. (1984). Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. *J Infect Dis* 149, 234-244.

McLeod, R., Frenkel, J. K., Estes, R. G., Mack, D. G., Eisenhauer, P. B., and Gibori, G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol* 140, 1632-1637.

Meisel, C., Bonhagen, K., Löhning, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Radbruch, A., and Kamradt, T. (2001). Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J Immunol* 166, 3143-3150.

Meyers, J. H., Ryu, A., Monney, L., Nguyen, K., Greenfield, E. A., Freeman, G. J., and Kuchroo, V. K. (2002). Cutting edge: CD94/NKG2 is expressed on Th1 but not Th2 cells and costimulates Th1 effector functions. *J Immunol* 169, 5382-5386.

- Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E. A., Coyle, A. J., Sobel, R. A., *et al.* (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536-541.
- Moritz, D. R., Rodewald, H. R., Gheyselinck, J., and Klemenz, R. (1998). The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* **161**, 4866-4874.
- Moser, B., and Loetscher, P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* **2**, 123-128.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173.
- Mowat, A. M., and Viney, J. L. (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* **156**, 145-166.
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* **292**, 1907-1910.
- Mullen, A. C., Hutchins, A. S., High, F. A., Lee, H. W., Sykes, K. J., Chodosh, L. A., and Reiner, S. L. (2002). Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* **3**, 652-658.
- Murphy, K. M. (1998). T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol* **10**, 226-232.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α o thymocytes in vivo. *Science* **250**, 1720-1723.
- Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T. L. (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* **18**, 451-494.
- Murphy, K. M., and Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 933-944.
- Neurath, M. F., Finotto, S., and Glimcher, L. H. (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* **8**, 567-573.
- Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., and Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6550-6554.
- North, R. J., Dunn, P. L., and Conlan, J. W. (1997). Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunol Rev* **158**, 27-36.
- O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**, 275-283.
- Ogilvie, B. M., and Hockley, D. J. (1968). Effects of immunity of *Nippostrongylus brasiliensis* adult worms: reversible and irreversible changes in infectivity, reproduction, and morphology. *J Parasitol* **54**, 1073-1084.
- Okazaki, T., Iwai, Y., and Honjo, T. (2002). New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol* **14**, 779-782.

- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.
- Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755.
- Ozkaynak, E., Gao, W., Shemmeri, N., Wang, C., Gutierrez-Ramos, J. C., Amaral, J., Qin, S., Rottman, J. B., Coyle, A. J., and Hancock, W. W. (2001). Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2, 591-596.
- Palucka, K., and Banchereau, J. (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14, 420-431.
- Pamer, E. G. (1994). Direct sequence identification and kinetic analysis of an MHC class I-restricted *Listeria monocytogenes* CTL epitope. *J Immunol* 152, 686-694.
- Pamer, E. G., Harty, J. T., and Bevan, M. J. (1991). Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353, 852-855.
- Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.
- Paul, W. E., and Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- Pernis, A., Gupta, S., Gollob, K. J., Garfein, E., Coffman, R. L., Schindler, C., and Rothman, P. (1995). Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 269, 245-247.
- Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., *et al.* (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, 779-790.
- Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.
- Prowse, S. J., Mitchell, G. F., Ey, P. L., and Jenkin, C. R. (1978). *Nematospiroides dubius*: susceptibility to infection and the development of resistance in hypothyroid (nude) BALB/c mice. *Aust J Exp Biol Med Sci* 56, 561-570.
- Randolph, D. A., Huang, G., Carruthers, C. J., Bromley, L. E., and Chaplin, D. D. (1999). The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. *Science* 286, 2159-2162.
- Reiner, S. L., and Locksley, R. M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13, 151-177.
- Rellahan, B. L., Jones, L. A., Kruisbeek, A. M., Fry, A. M., and Matis, L. A. (1990). In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* 172, 1091-1100.
- Richter, A., Löhning, M., and Radbruch, A. (1999). Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J Exp Med* 190, 1439-1450.
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S. B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., and O'Garra, A. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 7, 571-581.
- Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D. H., Gubler, U., and Sinigaglia, F. (1997). Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 185, 825-831.

- Rogge, L., Papi, A., Presky, D. H., Biffi, M., Minetti, L. J., Miotto, D., Agostini, C., Semenzato, G., Fabbri, L. M., and Sinigaglia, F. (1999). Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 162, 3926-3932.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Piccinni, M. P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2000). Cytokines and chemokines in T lymphopoiesis and T-cell effector function. *Immunol Today* 21, 416-418.
- Romagnani, S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12, 227-257.
- Rottman, J. B., Smith, T., Tonra, J. R., Ganley, K., Bloom, T., Silva, R., Pierce, B., Gutierrez-Ramos, J. C., Ozkaynak, E., and Coyle, A. J. (2001). The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol* 2, 605-611.
- Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., and Noelle, R. J. (1993). The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol* 151, 2497-2510.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161, 72-87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18-32.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277, 2005-2007.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18, 593-620.
- Salomon, B., and Bluestone, J. A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19, 225-252.
- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192, 1553-1562.
- Schieferdecker, H. L., Ullrich, R., Hirsland, H., and Zeitz, M. (1992). T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria. *J Immunol* 149, 2816-2822.
- Schubert, D., Maier, B., and Kamradt, T. (2003). in preparation.
- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176, 1091-1098.
- Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116-126.

- Sher, A., and Coffman, R. L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* 10, 385-409.
- Shevach, E. M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., *et al.* (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633.
- Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Sijts, A. J., Neisig, A., Neefjes, J., and Pamer, E. G. (1996). Two *Listeria monocytogenes* CTL epitopes are processed from the same antigen with different efficiencies. *J Immunol* 156, 683-692.
- Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240, 1169-1176.
- Sperling, A. I., and Bluestone, J. A. (2001). ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat Immunol* 2, 573-574.
- Suzuki, Y., and Remington, J. S. (1988). Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2⁺ and Lyt-1⁺, L3T4⁺ T cells in mice. *J Immunol* 140, 3943-3946.
- Swain, S. L. (1999). Helper T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 11, 180-185.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145, 3796-3806.
- Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185, 817-824.
- Szabo, S. J., Jacobson, N. G., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1995). Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 2, 665-675.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Tafari, A., Shahinian, A., Blatt, F., Yoshinaga, S. K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L. M., Bouchard, D., Chan, V. S., Duncan, G., *et al.* (2001). ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409, 105-109.
- Takahashi, S., Fossati, L., Iwamoto, M., Merino, R., Motta, R., Kobayakawa, T., and Izui, S. (1996). Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J Clin Invest* 97, 1597-1604.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303-310.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-630.

- Theofilopoulos, A. N., Koundouris, S., Kono, D. H., and Lawson, B. R. (2001). The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 3, 136-141.
- Theofilopoulos, A. N., and Lawson, B. R. (1999). Tumour necrosis factor and other cytokines in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1, 149-55.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 251-276.
- Trinchieri, G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 70, 83-243.
- Urban, J. F., Jr., Madden, K. B., Svetic, A., Cheever, A., Trotta, P. P., Gause, W. C., Katona, I. M., and Finkelman, F. D. (1992). The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev* 127, 205-220.
- Urban, J. F., Jr., Maliszewski, C. R., Madden, K. B., Katona, I. M., and Finkelman, F. D. (1995). IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *J Immunol* 154, 4675-4684.
- Urban, J. F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Collins, M., and Finkelman, F. D. (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255-264.
- Van Klinken, B. J., Dekker, J., Buller, H. A., and Einerhand, A. W. (1995). Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol* 269, G613-627.
- Wang, P. L., O'Farrell, S., Clayberger, C., and Krensky, A. M. (1992). Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol* 148, 2600-2608.
- Watt, S. M., Butler, L. H., Tavian, M., Buhring, H. J., Rappold, I., Simmons, P. J., Zannettino, A. C., Buck, D., Fuchs, A., Doyonnas, R., *et al.* (2000). Functionally defined CD164 epitopes are expressed on CD34(+) cells throughout ontogeny but display distinct distribution patterns in adult hematopoietic and nonhematopoietic tissues. *Blood* 95, 3113-3124.
- Watts, T. H., and DeBenedette, M. A. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* 11, 286-293.
- Weinberg, A. D., Vella, A. T., and Croft, M. (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 10, 471-480.
- Wurster, A. L., Tanaka, T., and Grusby, M. J. (2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 19, 2577-2584.
- Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J. H., and Liew, F. Y. (1998a). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* 187, 787-794.
- Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Hunter, D., Schulz, K., Carter, R. W., McInnes, I. B., Robinson, J. H., and Liew, F. Y. (1998b). Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 188, 1485-1492.
- Xu, D., Trajkovic, V., Hunter, D., Leung, B. P., Schulz, K., Gracie, J. A., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2000). IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol* 30, 3147-3156.
- Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., and Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166, 7282-7289.

- Yang, J., Zhu, H., Murphy, T. L., Ouyang, W., and Murphy, K. M. (2001). IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2, 157-164.
- Yap, G. S., and Sher, A. (1999). Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201, 240-247.
- Yin, Z., Braun, J., Neure, L., Wu, P., Eggens, U., Krause, A., Kamradt, T., and Sieper, J. (1997). T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthritis Rheum* 40, 69-79.
- Yoshida, H., Hamano, S., Senaldi, G., Covey, T., Faggioni, R., Mu, S., Xia, M., Wakeham, A. C., Nishina, H., Potter, J., *et al.* (2001). WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 15, 569-578.
- Yoshimoto, T., Mizutani, H., Tsutsui, H., Noben-Trauth, N., Yamanaka, K., Tanaka, M., Izumi, S., Okamura, H., Paul, W. E., and Nakanishi, K. (2000). IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 1, 132-137.
- Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.
- Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., and Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11, 473-482.
- Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., and Alderson, M. R. (1994). The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12, 456-465.
- Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., *et al.* (1998). The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* 161, 547-551.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Dr. Thomas Kamradt, der mir die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Deutschen Rheumaforschungszentrum ermöglicht hat, für seine wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Professor Lucius möchte ich hiermit danken, die Vertretung der Doktorarbeit im Fachbereich und alle damit verbundenen Arbeiten übernommen zu haben.

Mein Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kamradt und den anderen Mitarbeitern am DRFZ für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, freundliche Arbeitsatmosphäre und gute Stimmung im Labor. Für ihre Hilfsbereitschaft möchte ich mich besonders bei Bert Maier, Martin Baumgart, Kerstin Bonhagen, Rudi Manz und David Schubert bedanken. Ein sehr herzlicher Dank gilt Carmen Infante-Duarte für ihre liebevolle Hilfe und Motivation. Besonders herzlich danke ich Miso Kursar für seine freundschaftliche Hilfe im Labor und außerhalb.

Ich danke Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann und Tuula Geske für Antikörper, Puffer und ihre unermüdliche Freundlichkeit.

Ich bedanke mich auch bei Manuela Ohde und den anderen Tierpflegern für ihre Hilfe bei den Rückkreuzungen.

Mein ehrfürchtiger Dank gilt allen Mäusen, die ihr Leben für diese Arbeit gelassen haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immerzu unterstützt und motiviert haben.

Danke Mama, Papa, Oma, Wani, Na Noi und Birger für Eure Ermutigung und Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Es wurden keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 23. April 2003

Orissa Bender

Publikationen und Präsentationen

1. Beitrag mit dem Titel „Dauerhaftigkeit von peripherer T-Zelltoleranz in T-Zellrezeptor transgenen Mäusen“ zum DRFZ Jahresbericht 1998/1999.
2. Beitrag mit dem Titel „Charakterisierung der Expression von humanem T1/ST2“ zum DRFZ Jahresbericht 1998/1999.
3. Beitrag mit dem Titel „Immunological characterisation of murine 8H7 Ag expressing T helper cells“ zum DRFZ Jahresbericht 1999/2000.
4. Beitrag mit dem Titel „Immunologische Charakterisierung muriner TIM-3 exprimierender T Zellen“ zum DRFZ Jahresbericht 2000/2001.
5. Beitrag mit dem Titel „Immunological characterisation of the TIM-3 molecule“ zum DRFZ Jahresbericht 2001/2002.
6. Posterpräsentation (25.-28.09.02) mit dem Titel „Functional abilities of TIM-3 expressing murine T helper lymphocytes“ auf der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Marburg, Deutschland.
7. Vortrag mit dem Titel „Durability of peripheral T cell tolerance in T cell receptor transgenic mice“ am 8. Dez. 1998, Institutsseminar, DRFZ.
8. Vortrag mit dem Titel „Initial characterisation of 8H7 positive murine T Helper Cells“ am 16. Nov. 1999, Institutsseminar, DRFZ.
9. Vortrag mit dem Titel „Initial characterisation of a novel murine Th differentiation marker“ am 9. Jan. 2001, Institutsseminar, DRFZ.
10. Vortrag mit dem Titel „TIM-3 expression on murine T lymphocytes“ am 5. März 2002, Institutsseminar, DRFZ.
11. Vortrag mit dem Titel „TIM-3 expression on murine T lymphocytes“ am 6. Nov. 2002 im Institut für Parasitologie.

Berlin, den 23. April 2003

Orissa Bender